

Aspects du métabolisme des hydrates de carbone
et des lipides dans le foie perfusé de souris normales
et obèses-hyperglycémiques

Thèse

présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en biologie médicale

par

Françoise ASSIMACOPOULOS-JEANNET

de Genève

Thèse No 11

Aspects du métabolisme des hydrates de carbone
et des lipides dans le foie perfusé de souris normales
et obèses-hyperglycémiques

Thèse

présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en biologie médicale

par

Françoise ASSIMACOPOULOS-JEANNET

de Genève

Thèse N° 11

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Bernard Jeanrenaud autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 31 juillet 1974..

Thèse N° 11.

Le doyen :
William Geisendorf



Thèse N° 3407.

Ce travail de thèse a été effectué dans les Laboratoires de recherches médicales, dirigés par le professeur B. Jeanrenaud, avec la collaboration de l'Institut de biochimie clinique, dirigé par le professeur A.E. Renold. Il a bénéficié du support financier du Fonds national suisse de la Recherche scientifique (Fonds n° 3.552.71 et 3.8080.72 SR) et de subsides de Nestlé-Alimentana (Vevey) et Zyma (Nyon).

Je remercie tous les collaborateurs des Laboratoires de recherches médicales et de l'Institut de biochimie clinique qui, par leurs suggestions, critiques et encouragements ont contribué à la réalisation de ce travail.

La partie technique de cette étude a bénéficié de la compétence de Mesdames J. Piroud-Petitjean, H. Petersen et de Mademoiselle M. Brunsmann. Je leur exprime ici toute ma gratitude pour leur collaboration très efficace.

Je remercie sincèrement Mademoiselle M. Kassem d'avoir bien voulu dactylographier cette thèse.

Lors de ses débuts, ce travail a bénéficié de la participation et de l'expérience du professeur J. Exton de Nashville que je remercie.

Enfin, je tiens à dire toute ma reconnaissance au professeur B. Jeanrenaud qui m'a constamment conseillée et encouragée au cours de la réalisation de ce travail.

I. <u>I N T R O D U C T I O N</u>	1
A. <u>GLUCONEOGENESE</u>	2
1. La gluconéogenèse hépatique	2
a) Voies gluconéogéniques	2
2. Régulation de la gluconéogenèse	4
a) Rôle des substrats	4
b) Action des hormones	5
c) Rôle des acides gras	10
B. <u>GLYCOGENOLYSE</u>	11
1. Synthèse et dégradation du glycogène	11
2. Régulation hormonale de la glycogénolyse	12
C. <u>LA SOURIS OBESE HYPERGLYCEMIQUE (<u>ob/ob</u>) DE BAR HARBOR</u>	14
1. Caractères généraux	14
2. Résistance à l'insuline	14
3. Lipogenèse chez la souris obèse hyperglycémique	15
4. Synthèse des acides gras	17
II. <u>M A T E R I E L E T M E T H O D E S</u>	
A. <u>DESCRIPTION DE LA PERFUSION</u>	20

1. Description de l'appareil	20
2. Etablissement de la perfusion	22
<u>B. MILIEU DE PERFUSION</u>	23
1. Milieu de perfusion utilisé pour l'étude de la glycogénolyse	23
2. Milieu de perfusion utilisé pour l'étude de la lipogenèse et la sécrétion de triglycérides	24
<u>C. ANALYSE DU FOIE</u>	26
1. Glycogène	26
2. ATP	26
3. Triglycérides hépatiques	28
4. Lipides marqués	28
<u>D. ANALYSE DU PERFUSAT</u>	29
1. Glucose	29
2. Lactate, Pyruvate	30
3. β -hydroxybutyrate, Acétoacétate	32
4. Urée	33
5. Acides gras	34
6. Triglycérides	36
7. Triglycérides marqués, activité spécifique	38
8. Glucose marqué	38
9. CO_2 marqué	39

E. ANIMAUX	40
------------	----

F. EXPRESSION DES RESULTATS	41
-----------------------------	----

III. R E S U L T A T S

<u>PARTIE I</u>	42
-----------------	----

1. Gluconéogenèse en présence de substrats à des concentrations sub-maximales	42
2. Gluconéogenèse à partir de substrats à des concentrations physiologiques	43
3. Absence d'effet des acides gras sur la gluconéogenèse	44
4. Absence d'effet des hormones (glucagon, adrénaline) et de l'AMP cyclique sur la gluconéogenèse	45
5. Effet du glucagon, de l'adrénaline et de l'AMP cyclique sur la glycogénolyse dans le foie perfusé de souris nourries	47

PARTIE II

1. Gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins	47
2. Lipogenèse à partir de pyruvate dans le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins	49
3. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé des souris obèses-hyperglycémiques et des souris témoins	51

4. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé des souris obèses-hyperglycémiques et des souris témoins en présence de différents substrats.	52
Relation avec la libération de triglycérides nouvellement synthétisés	
5. Sécrétion de triglycérides par le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins: céto-genèse	53
6. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques traitées à la streptozotocine	54
7. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins traitées au sérum anti-insuline (SAI)	55
8. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins: effet des acides gras dans le perfusat	55

IV. D I S C U S S I O N

PARTIE I 57

1. Perfusion	57
2. Gluconéogenèse	58
3. Céto-genèse	58
4. Substrats à dose physiologique	59

5. Absence d'effet des acides gras sur la gluconéogenèse	59
6. Absence d'effet du glucagon et de l'AMP cyclique sur la gluconéogenèse	61
7. Régulation de la gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris	62
8. Glycogénolyse	64

<u>PARTIE II</u>	65
------------------	----

1. Gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris obèses et témoins	65
2. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé des souris obèses-hyperglycémiques et des souris témoins	65
3. Sécrétion des triglycérides par le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et témoins	66
4. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques traitées à la streptozotocine et au sérum anti-insuline	66
5. Effet des acides gras sur la lipogenèse	67
6. Conclusion	68

BIBLIOGRAPHIE	70
---------------	----

I. INTRODUCTION

Bien que l'idée et la réalisation d'une perfusion de foie soit très ancienne (Claude Bernard 1855) c'est en 1951 que Miller a introduit et développé la technique du foie perfusé (53) qui a permis l'étude de maints aspects du métabolisme des lipides et des hydrates de carbone, ainsi que de sa régulation.

La plupart des expérimentateurs ont utilisé le foie perfusé de rat ou de cobaye en vue d'étudier la gluconéogenèse et sa régulation par différents substrats et hormones (16,19,21,26,46, 59,65), l'effet des acides gras sur ce processus (64,69,76,79), ainsi que la lipogenèse et la sécrétion de triglycérides (9,43,61, 81).

Il nous a semblé intéressant d'adapter cette technique au foie de souris pour étudier, dans un premier temps, la gluconéogenèse et sa régulation. En effet, une fois cette technique mise au point, il nous paraissait important de mieux comprendre certains aspects du métabolisme des lipides et des hydrates de carbone chez des souris ayant des anomalies métaboliques telle le diabète associé à l'obésité.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié la glycogénolyse et la gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris albino normale, ainsi que le rôle des substrats, des hormones et des acides gras sur la gluconéogenèse.

Dans la seconde partie du travail, nous avons étudié, brièvement, la gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris obèses hyperglycémiques (ob/ob) et dans celui de témoins non-obèses, puis nous nous sommes intéressés en détail au métabolisme

des lipides dans le foie perfusé de ces animaux car les anomalies les plus frappantes ont été observées au niveau de la lipogenèse, de la sécrétion des triglycérides et de l'oxydation des acides gras. Finalement, nous avons essayé de voir si l'hyperinsulinisme des souris obèses-hyperglycémiques pouvait jouer un rôle étiologique dans les anomalies observées.

A. GLUCONEOGENESE

1. La gluconéogenèse hépatique

La réserve en glycogène hépatique n'est pas suffisante pour assurer un apport constant de glucose lors d'un jeûne prolongé. Dès lors, la seule source de glucose est la gluconéogenèse hépatique et rénale, cette dernière ne prenant une grande importance que lors de l'absence prolongée de prise alimentaire. Les deux fonctions principales de la gluconéogenèse sont la conversion des produits de la glycolyse (lactate, pyruvate) en glucose et l'utilisation pour la néo-synthèse du glucose des acides aminés et du glycérol.

Les substrats de la gluconéogenèse proviennent donc principalement des tissus extra-hépatiques (muscles et globules rouges pour le lactate, tissu adipeux pour le glycérol, muscle pour les acides aminés). Par conséquent, tout facteur modifiant leur concentration dans le sang aura un effet indirect sur la gluconéogenèse.

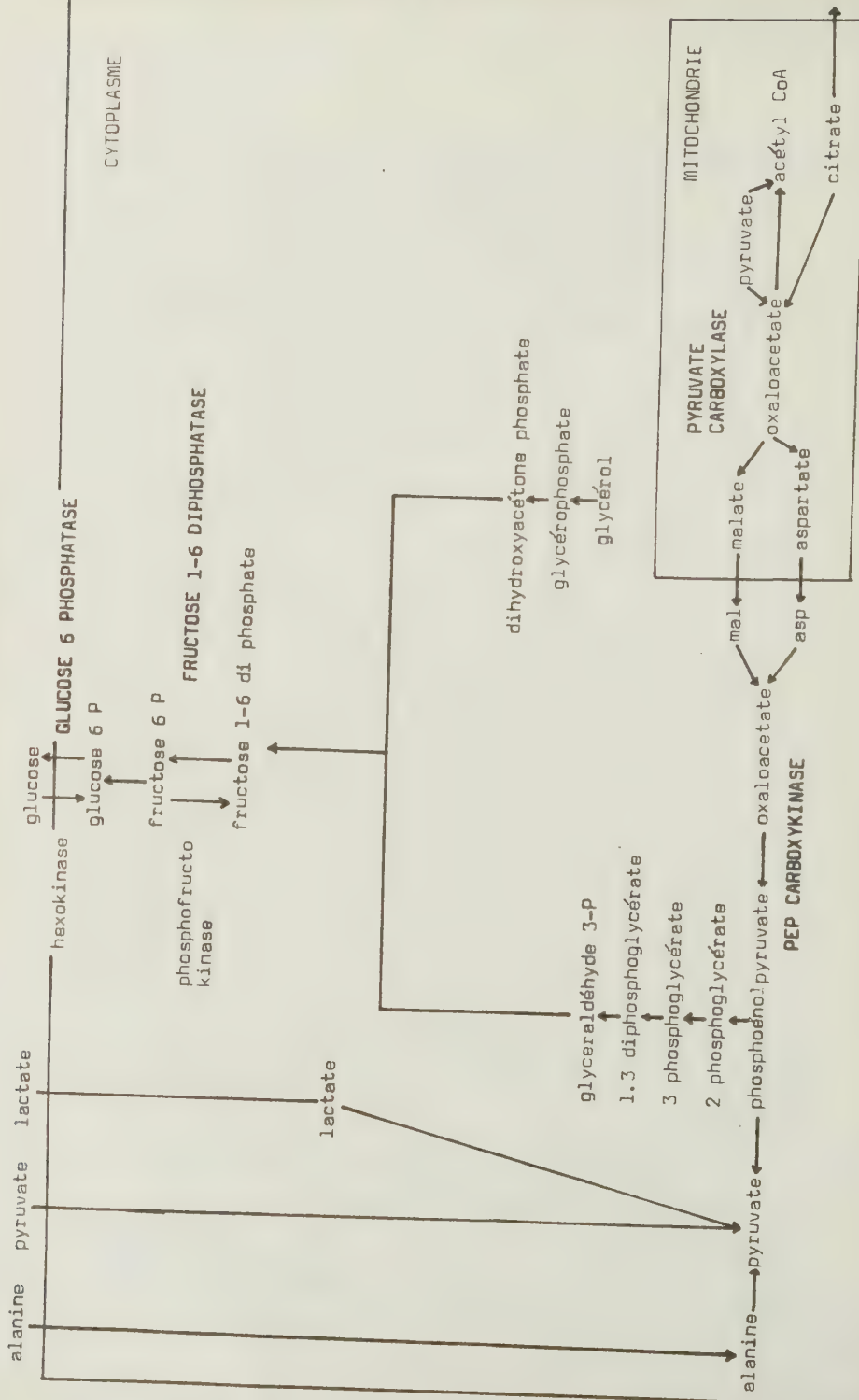
a) Voies gluconéogéniques

Du point de vue des réactions enzymatiques qui y sont

impliquées, la gluconéogenèse n'est pas simplement une glycolyse inversée. Il existe des "enzymes-clé" de la gluconéogenèse qui constituent autant d'étapes irréversibles (figure 1). L'activité de chacune de ces "enzymes-clé" est importante et constitue un site potentiel de régulation de la gluconéogenèse. Si nous considérons le pyruvate comme précurseur, ce substrat est carboxylé en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase, dans les mitochondries, avec l'acétyl CoA (72) comme activateur allostérique. En présence d'acétyl CoA, la quantité d'oxaloacétate formé est également dépendante de la concentration du pyruvate. L'activité des autres enzymes métabolisant le pyruvate (pyruvate déshydrogénase, pyruvate kinase) peut donc affecter indirectement la gluconéogenèse en modifiant la quantité de pyruvate disponible pour la pyruvate carboxylase. La phosphoénolpyruvate carboxykinase, localisée, selon les espèces, dans les mitochondries (pigeon), dans les mitochondries et le cytoplasme (cobaye, homme), dans le cytoplasme uniquement (rat) semble être un des sites de régulation les plus importants de la gluconéogenèse. L'activité de cette enzyme dans le foie de rat augmente lors du jeûne (63), après administration de glucagon ou de glucocorticoïdes ou dans le diabète induit par l'alloxane. Dans le foie de cobaye, l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxykinase change après traitement aux glucocorticoïdes ou après une période de jeûne, mais seule la fraction cytoplasmique est modifiée.

La phosphoénolpyruvate carboxykinase décarboxyle l'oxaloacétate en fixant un groupe phosphoryle provenant du GTP, pour former le phosphoénolpyruvate qui est converti en fructose-1-6-diphosphate par la voie inversée de la glycolyse. Le fructose-1-6-diphosphate

Figure 1: Schéma de la gluconéogenèse



est hydrolysé en fructose-6-phosphate par la fructose-diphosphatase, une enzyme cytoplasmique présente dans le foie et dans le rein. La fructose diphosphatase est inhibée par l'AMP alors que la phosphofructokinase est stimulée par ce nucléotide. L'AMP contrôle donc l'activité de ces deux enzymes de façon opposée. La gluconéogenèse n'a pas lieu si l'apport en énergie est limité. Par contre, si du glucose est disponible, la glycolyse peut être initiée. Cette régulation par l'AMP évite un gaspillage d'ATP.

Le glucose-6-phosphate est hydrolysé en glucose par la glucose-6-phosphatase, enzyme présente dans le foie et dans le rein et localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Son activité est inhibée par le glucose.

2. Régulation de la gluconéogenèse

a) Rôle des substrats: La gluconéogenèse peut être partiellement ou totalement contrôlée par l'apport de substrats, le lactate est l'un des principaux substrats de la synthèse de glucose. Il provient surtout de la glycolyse musculaire pendant l'exercice ainsi que des globules rouges. La concentration qui produit une gluconéogenèse semi-maximale chez le rat est de l'ordre de 2 mM soit 2 fois la concentration plasmatique basale. Une autre série importante de substrats est constituée par les acides aminés provenant soit d'une protéolyse (jeûne, diabète) soit d'un apport alimentaire riche en protéines. Le foie de rat perfusé avec un mélange d'acides aminés en concentrations physiologiques augmente sa production de glucose et d'urée. Parmi les acides aminés, les principaux précurseurs sont l'alanine et la sérine suivis de la proline, de la thréonine, du glutamate, de la glutamine et de

l'asparagine (58). Chez le rat, la contribution du glycérol comme substrat glucoformateur semble peu importante, bien que la concentration produisant une synthèse semi-maximale de glucose (0.5 mM) soit peu en dessus de la concentration physiologique (0.1 mM). Sa concentration est augmentée dans des situations où les graisses sont mobilisées (jeûne, diabète, catécholamines). Il joue cependant un rôle important surtout chez les ruminants.

b) Action des hormones: Glucagon, catécholamines.

Les expériences faites sur le foie perfusé de rat ont montré que la gluconéogenèse peut être contrôlée au niveau hépatique par différentes hormones agissant en l'espace de quelques secondes à quelques minutes (glucagon, catécholamines, insuline) ou plus lentement (glucocorticoïdes). L'action rapide des premières n'exclut pas une influence secondaire, à plus long terme sur la synthèse des protéines par exemple. Une action du glucagon sur la gluconéogenèse dans le foie perfusé de rat a été suggérée en premier par Miller (52) qui observa une augmentation de la production d'urée après infusion de glucagon. Des études plus précises, au cours desquelles l'incorporation de ^{14}C -lactate, ^{14}C -pyruvate et ^{14}C -alanine en ^{14}C -glucose a été mesurée ont montré que le glucagon augmente non seulement la production de glucose non radioactif (glycogénolyse), mais également celle de glucose marqué (gluconéogenèse) (21,26,59). Les concentrations de glucagon stimulant la gluconéogenèse (2×10^{-11} M) chez le foie de rat perfusé sont comparables aux concentrations plasmatiques de glucagon.

Les catécholamines (adrénaline, noradrénaline) stimulent

la gluconéogenèse de la même façon que le glucagon dans le foie perfusé de rat. Les concentrations nécessaires pour obtenir un effet sont cependant beaucoup plus élevées (10^{-7} M) (19) et rendent peu vraisemblable une action physiologique de ces hormones.

AMP cyclique: Plusieurs observations permettent de conclure que l'augmentation de la gluconéogenèse (tout comme celle de la glycogénolyse) produite par le glucagon et les catécholamines est réalisée grâce à une activation de l'adényl cyclase qui a pour conséquence une augmentation de la concentration intracellulaire de l'AMP cyclique. En effet: a) Ces hormones ne stimulent la synthèse de glucose qu'à des concentrations qui augmentent également l'AMP cyclique. b) L'augmentation de l'AMP cyclique précède de 40 à 60 secondes la production de glucose. c) Dans le foie perfusé, l'adjonction d'AMP cyclique produit les mêmes effets que l'addition de glucagon. d) L'AMP cyclique produit les mêmes changements que le glucagon sur la concentration des métabolites tissulaires des foies perfusés en présence de lactate. Pour effectuer ces mesures, le foie est perfusé soit avec le précurseur seul, soit avec le précurseur en présence de glucagon ou d'AMP cyclique. Les intermédiaires entre le lactate et le glucose sont mesurés dans le foie après perfusion. On compare le niveau de ces intermédiaires dans les foies perfusés avec lactate plus glucagon (ou plus AMP cyclique) à celui des intermédiaires dans les foies perfusés avec lactate seul qui est pris comme référence (100%). Dans les foies perfusés avec lactate en présence de glucagon ou d'AMP cyclique on constate une diminution de la concentration des intermédiaires situés avant le phosphoénolpyruvate et une augmentation de 100 à 200% de la concentration de celui-ci. On voit également une augmentation de

50 à 100% de la concentration du glucose-6-phosphate et du glucose. Ces constatations suggèrent fortement (sans le prouver) qu'une étape métabolique située entre le pyruvate et le phosphoenolpyruvate a été accélérée, produisant une diminution de la concentration des intermédiaires situés "en amont" et une augmentation du phosphoenolpyruvate (19,20,21).

La gluconéogenèse à partir de fructose, de dihydroxyacétone et de glycérol n'est pas modifiée par le glucagon ni par l'AMP cyclique. Ces substrats entrent dans la voie gluconéogénique soit au niveau des trioses phosphates (glycérol, dihydroxyacétone) soit au niveau du fructose-1-phosphate; ces constatations fournissent une preuve supplémentaire de l'action du glucagon et de l'AMP cyclique avant les trioses phosphates. Dans un travail plus récent (71) Ui et Park montrent que si on bloque spécifiquement la phosphoenolpyruvate carboxykinase avec le tryptophane, l'effet du glucagon sur la gluconéogenèse à partir de lactate marqué est supprimé et on mesure une accumulation tissulaire de malate et d'aspartate marqués.

Chez le rat, la gluconéogenèse à partir d'alanine est également stimulée par le glucagon et l'AMP cyclique (20); dans ce cas, en plus de l'activation enzymatique avant les trioses phosphates, on constate une stimulation du transport de cet acide aminé dans la cellule hépatique.

L'action du glucagon et de l'AMP cyclique sur la gluconéogenèse est bien décrite chez le rat. Des expériences similaires avec le foie perfusé de cobaye (65) ont montré que, chez cet animal, ni le glucagon ni le dibutyryl cyclic AMP n'exercent d'action stimulante sur la gluconéogenèse, bien qu'ils augmentent l'uréo-

genèse et la cétogenèse. Cette différence entre les deux espèces est attribuée à une localisation différente de la phosphoénolpyruvate carboxykinase qui, chez le cobaye se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries où elle est probablement inaccessible à l'action du glucagon.

Insuline: L'insuline, en plus de son action périphérique sur la libération de glycérol, de lactate et d'acides aminés, exerce également une action directe sur le foie. Des rats, à qui on a injecté du sérum anti-insuline 1 heure avant de perfuser leur foie avec du lactate, produisent plus de glucose que les animaux contrôles. Cette production peut être ramenée aux valeurs des animaux contrôles par l'infusion d'insuline dans le perfusat (20,22).

Dans le foie perfusé de rats nourris, l'insuline diminue la sortie de glucose (inhibition de la glycogénolyse), elle diminue également la sortie de glucose marqué, après adjonction de lactate-¹⁴C (diminution de la gluconéogenèse). Son action est opposée à celle du glucagon; en effet, en ajoutant de l'insuline en quantité suffisante à un foie perfusé avec du glucagon, on parvient à supprimer l'action de celui-ci sur la glycogénolyse, la gluconéogenèse, l'uréogenèse et la cétogenèse; de plus l'insuline supprime l'augmentation tissulaire d'AMP cyclique produite par le glucagon. Son action antagoniste a donc pour médiateur probable une diminution de l'AMP cyclique initialement augmenté par le glucagon. Chez des rats rendus diabétiques par l'alloxane on observe une augmentation de la gluconéogenèse, de l'AMP cyclique et de l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxykinase, ainsi qu'une diminution de l'acétyl CoA. Une injection d'insuline in vivo rétablit ces paramètres au niveau des animaux contrôles en quelques

heures (22).

Glucocorticoïdes: L'observation que des animaux sur-rénalectomisés ne survivent pas à un jeûne prolongé par défaut de gluconéogenèse, a conduit plusieurs expérimentateurs à étudier le rôle des glucocorticoïdes dans la gluconéogenèse du foie perfusé de rats nourris, à jeun ou rendus diabétiques par l'alloxane. Chez des animaux nourris, la synthèse de ^{14}C -glucose à partir de ^{14}C -lactate n'est pas différente dans les deux groupes (contrôles et surrénalectomisés). Par contre, si les rats sont à jeun ou sont diabétiques on observe une très forte diminution de la gluconéogenèse chez les animaux surrénalectomisés, l'injection de cortisol 12 heures avant la perfusion restaurant la gluconéogenèse. Les glucocorticoïdes ne semblent donc pas nécessaires à la gluconéogenèse basale mais semblent essentiels dans des situations où elle est stimulée (jeûne, diabète) (20,23). La mesure des intermédiaires tissulaires montre que, dans cette situation une étape entre le pyruvate et le phosphoénolpyruvate est ralentie, produisant une accumulation de pyruvate, lactate et malate ainsi qu'une diminution du phosphoénolpyruvate. Une injection de cortisol rétablit la concentration des métabolites intermédiaires aux valeurs des témoins. L'action des glucocorticoïdes sur la gluconéogenèse implique probablement la synthèse de protéines. Ces hormones augmentent la synthèse de plusieurs enzymes hépatiques dont la glucose-6-phosphatase (21), la fructose-1-6-diphosphatase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (88) et la pyruvate carboxylase (35).

c) Rôle des acides gras:

Dans le foie perfusé de rat, plusieurs travaux relatent un effet stimulateur des acides gras sur la gluconéogenèse (64, 69,76) alors que d'autres travaux semblent rejeter cette action (18,59), expliquant que les acides gras en concentration physiologique et liés à l'albumine n'ont aucun effet sur la gluconéogenèse, alors que ce sont seulement les acides gras en excès, non liés à l'albumine qui stimulent la gluconéogenèse.

Des expériences où le foie de rat est perfusé avec des acides gras en présence d'un inhibiteur de l'oxydation de ceux-ci, l'acide pent-4-énoic, ont montré une forte inhibition de la gluconéogenèse à partir d'alanine ainsi que de la cétoenèse. La gluconéogenèse peut-être rétablie par l'adjonction d'éthanol, un substrat fournissant du NADH cytoplasmique (60).

Il paraît difficile de tirer une conclusion de travaux aussi divergents; cependant, Garfinkel, en se basant sur un modèle analogique dans lequel il a introduit les concentrations des intermédiaires et les constantes d'équilibre, a montré que ces groupes utilisent des rats différents chez lesquels l'apport endogène d'acides gras varie beaucoup. Ainsi, la gluconéogenèse augmente en fonction de la concentration des acides gras, jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint à partir duquel gluconéogenèse et apport d'acides gras cessent d'être interdépendants. Selon l'apport endogène d'acides gras, on se situe dans le premier ou le second cas (27,28,29). Nous verrons que ces observations sont importantes en ce qui concerne le rôle des acides gras sur la gluconéogenèse du foie perfusé de la souris.

Il faut également mentionner que, chez le cobaye, les acides gras ajoutés dans le perfusat inhibent la gluconéogenèse

à partir de lactate probablement à cause d'un état ox/red du cytoplasme plus réduit (65).

B. GLYCOGENOLYSE

1. Synthèse et dégradation du glycogène

La synthèse de glycogène à partir de glucose nécessite l'action de plusieurs enzymes (glucokinase, phosphoglucomutase UDPG phosphorylase, glycogène synthétase). La glycogène synthétase est la plus importante pour la régulation de la glycogénonéogenèse et existe sous deux formes:

- une forme active, la glycogène synthétase a
- une forme inactive, la glycogène synthétase b

On peut passer de la forme a, à la forme b, par l'intermédiaire d'une kinase qui fixe un groupe phosphoryle, provenant de l'ATP et, dans l'autre sens (forme b $\rightarrow$ a) par l'action d'une phosphatase. La kinase qui catalyse la phosphorylation de l'enzyme est elle-même activée par l'AMP cyclique, elle sera active en même temps que la phosphorylase kinase. Le stimulus qui augmente la glycogénolyse exerce en même temps une action inhibitrice sur la synthèse de glycogène en favorisant la glycogène synthétase b.

La dégradation du glycogène fait intervenir une phosphorylase, l'amylo-1-6-glucosidase, la phosphoglucomutase et la glucose-6-phosphatase. L'enzyme qui contrôle la dégradation est la phosphorylase, une enzyme existant sous une forme active (phosphorylase a) et une forme inactive (phosphorylase b), le passage de la forme b à la forme a est sous la dépendance d'une

phosphorylase kinase, elle-même stimulée par l'AMP cyclique. La succession d'événements lors de la glycolyse est la suivante:

- augmentation de l'AMP cyclique (glucagon par ex.)
- l'AMP cyclique active la protéine kinase qui catalyse la phosphorylation de la phosphorylase kinase
- la phosphorylase kinase catalyse la conversion de phosphorylase b en phosphorylase a

L'inactivation de la phosphorylase a est faite par la phosphorylase phosphatase, elle-même activée par le glucose et les glucocorticoïdes et inhibée par le glycogène (13).

2. Régulation hormonale de la glycogénolyse

Le glucagon produit une élévation de l'AMP cyclique intracellulaire, qui a pour conséquence d'une part une augmentation de la synthétase kinase (passage de la synthétase a à b) d'autre part une augmentation de la conversion de la phosphorylase b en phosphorylase a. Cette dernière maintient la synthétase phosphatase inhibée. De cette façon, le foie ne peut pas synthétiser et dégrader le glycogène simultanément (13).

Les catécholamines, qui augmentent également l'AMP cyclique dans le foie ont aussi une action glycogénolytique. Il faut cependant des concentrations très élevées d'adrénaline pour augmenter la production de glucose.

L'insuline peut agir sur le métabolisme du glycogène de deux manières. Elle peut d'une part diminuer, l'action du glucagon sur l'AMP cyclique et s'opposer ainsi à la glycogénolyse, d'autre part, en présence de glucose, elle peut produire une activation de la synthétase et une inhibition de la phosphorylase.

Chez des souris nourries ou à jeun, une injection de prednisolone est suivie d'une augmentation de la synthèse de glycogène et d'une diminution de la concentration de glucose-6-phosphate et d'UDPG. La glycogène synthétase est convertie en forme a. L'effet de la prednisolone n'est pas la conséquence d'une hyperglycémie, il peut être obtenu chez des animaux diabétiques (13). La glycogénolyse hépatique est stimulée principalement par le glucagon et les catécholamines. C'est la sensibilité à ces hormones que nous essayerons de déterminer dans le foie perfusé de souris, en mesurant la production de glucose en fonction de la concentration hormonale.

C. LA SOURIS OBESE HYPERGLYCEMIQUE (ob/ob) DE BAR HARBOR

1. Caractères généraux

La souris obèse hyperglycémique (ob/ob) de Bar Harbor a été souvent considérée comme représentant un modèle possible du diabète humain de type adulte. Cet animal, dès la 4^e semaine, présente une légère hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une obésité, ainsi qu'une hyperphagie modérée. L'insulinémie et l'obésité augmentent jusqu'à la 20-25^e semaine, puis restent stable (74). L'hyperglycémie se stabilise vers 12 semaines (7). L'hyperinsulinémie va de pair avec une hyperplasie des cellules β des îlots de Langerhans et une augmentation du contenu du pancréas en insuline (66). Le tableau 1, qui présente les caractéristiques principales de ces animaux, montre en particulier que l'insulinémie atteint des valeurs 15 à 20 fois plus élevées que celle des témoins, l'hyperglycémie reste modérée.

2. Résistance à l'insuline

L'hyperglycémie de la souris ob/ob a été attribuée à une résistance de certains tissus à l'action de l'insuline. En effet, le muscle diaphragmatique de la souris ob/ob incorpore considérablement moins de glucose marqué en glycogène que celui de la souris normale. De plus, la synthèse de glycogène à partir du glucose par le diaphragme de la souris ob/ob n'est pas stimulée par l'insuline, même utilisée à des doses considérables, de l'ordre de 10.000 μ U/ml (66). Il est ainsi concevable que cette résistance périphérique à l'action de l'insuline puisse contribuer à l'hyperglycémie et ainsi à l'hyperinsulinémie. Laquelle de

Tableau 1

Caractéristiques des souris obèses hyperglycémiques

Age (semaines)	Poids (g)	Lipides totaux (g)	% du poids corporel constitué par les lipides	IRI plasmatique (ng/ml)	IRI pancréatique (ng/pancréas)	glycémie mg%	
Témoins	9 - 12	23,5	2,7	10,6	1,0	8057	150
Obèses	9 - 12	42,3	20,8	49,2	18,3	18925	260

IRI: insulin immunoréactive

l'hyperglycémie ou de l'hyperinsulinémie est le facteur primaire et laquelle la conséquence demeure, pour l'instant, indéterminé. On a pu montrer que le tissu adipeux de la souris ob/ob ne répond pas, in vitro, à l'adjonction d'insuline par une augmentation de la lipogénèse comme cela est le cas pour le tissu adipeux de la souris normale (E.G. Loten, manuscrit en préparation). Cependant si ce même tissu provenant de la souris ob/ob est pré-incubé pendant 15 minutes, en l'absence d'insuline puis incubé en présence de cette hormone, la stimulation de la lipogénèse par l'insuline réapparaît. Cela suggère que le tissu adipeux de la souris ob/ob a perdu, pendant la pré-incubation, un facteur qui empêchait l'action de l'insuline. Il est très vraisemblable que ce facteur soit l'insuline elle-même et que, si le tissu adipeux est ainsi "résistant" à l'action de l'insuline exogène cela soit dû au fait que ce tissu est déjà stimulé, de façon maximale, par le taux excessif d'insuline endogène (E.G. Loten, manuscrit en préparation).

Ainsi, si la résistance à l'insuline de la souris ob/ob est un phénomène réel démontré par l'existence simultanée d'une hyperglycémie et d'une hyperinsulinémie, sa nature demeure encore complexe et, en fait, inconnue.

3. La lipogénèse chez la souris obèse hyperglycémique

La caractéristique la plus frappante de la souris ob/ob est l'accumulation et l'infiltration de graisse sous-cutanée, péritanéale et rétropéritonéale qui est due à la fois à une hypertrophie des adipocytes et, dans une certaine mesure, à une multiplication des cellules adipeuses. Dès la quatrième semaine,

alors que le poids corporel est encore semblable à celui des souris témoins, la composition corporelle est différente, et la proportion de lipides est déjà considérablement élevée. Cette observation a conduit tout naturellement à l'étude de la lipogenèse chez cet animal. In vivo, l'incorporation d'acétate-1-¹⁴C dans les lipides est plus importante chez les souris obèses (3). Si l'apport alimentaire est réduit à la moitié de celui des témoins, les souris obèses incorporent toujours davantage d'acétate dans les lipides de la carcasse et du foie que les témoins nourris ad libitum. Après une injection d'une dose traçante de glucose uniformément marqué à des souris obèses et témoins on trouve plus de radioactivité dans les lipides du tissu adipeux et du foie chez les souris obèses (49). Bien que dans ce type d'expérience in vivo, l'activité spécifique du glucose soit différente dans les deux groupes, elle est en fait plus basse chez les animaux obèses, ce qui sous-estime les résultats obtenus pour ces derniers. Les observations faites sur le tissu adipeux et le foie in vitro confirment les résultats obtenus in vivo. La lipogenèse à partir d'acétate ou de précurseurs hydrocarbonés est plus importante dans le tissu adipeux incubé de souris obèses que dans celui des témoins (39). Le foie des souris ob/ob est hypertrophié et infiltré de lipides, principalement des triglycérides dont les acides gras ne sont pas ou peu saturés (80). La mesure de l'activité des enzymes lipogéniques montre une nette augmentation, dans le foie de la souris ob/ob de l'acétyl CoA carboxylase, de la palmitate synthétase (10) de la citrate lyase (44), de l' α -glycérophosphate déhydrogénase et de la glucose-6-phosphate déhydrogénase (25).

En plus d'une modification de la lipogenèse hépatique on

note également une diminution de la β -oxydation et de la cétogenèse (80). L'augmentation de la lipogenèse et la diminution de l'oxydation des acides gras contribuent toutes deux à l'accumulation de lipides intrahépatiques. Winand (80) étudiant l'incorporation de différents substrats dans les diverses fractions lipidiques du foie soit in vivo soit in vitro, dans des tranches de foie incubées, a décrit une augmentation de 10 fois in vivo et de 3 fois in vitro, de l'incorporation d'acétate- 1^{14}C dans les triglycérides. Il n'observe pas de modifications de la synthèse des phospholipides. Parmi les acides gras synthétisés, l'oléate est le mieux représenté. In vitro, l'auteur décrit également une augmentation de l'estérification de palmitate et de stéarate marqué.

Il est important de noter, que l'étude du métabolisme lipidique au niveau du foie perfusé de la souris ob/ob n'a jamais été entreprise jusqu'ici, ni l'analyse détaillée et, si possible, l'origine des désordres de ce métabolisme dont le résultat final est l'infiltration graisseuse notée ci-dessus. C'est cette étude et cette analyse qui ont constitué l'objectif du présent travail.

4. Synthèse des acides gras

La biosynthèse des acides gras est un processus cytoplasmique (73). Le point de départ est l'acétyl-CoA qui peut avoir deux sources:

- la dégradation des acides gras
- la dégradation des hydrates de carbone en pyruvate puis en acétyl-CoA

Ces deux processus sont mitochondriaux et la membrane mitochondriale ne possède pas de système de transport de l'acétyl-CoA; celui-ci la traverse surtout sous forme de citrate, par combinaison avec l'oxaloacétate. A l'extérieur de la mitochondrie, la citrate lyase, avec une molécule d'ATP, clive le citrate en oxaloacétate et acétyl-CoA. L'acétyl-CoA peut également sortir des mitochondries sous forme d'acétyl-carnitine.

La première étape de la synthèse des acides gras est la formation de malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase, d'après la réaction



La chaîne malonyle est transférée sur un "acyl carrier protein" ou ACP.

L'étape suivante est effectuée par le complexe enzymatique de l'acyl-CoA synthétase (ou palmityl-synthétase). Ce complexe condense un acyl-ACP avec le malonyl-ACP, pour former l'acétoacétyl-ACP, avec perte d'un CO_2 . Ce composé est réduit par le NADPH pour former le β -hydroxybutyryl-ACP qui, après le départ d'une molécule d'eau, forme le crotonyl-ACP. Ce dernier subit une réduction en butyryl-ACP; il peut dès lors recommencer le cycle et fixer un nouveau malonyl-CoA.

Chaque cycle permet la fixation de 2 carbones appartenant initialement à l'acétyl-CoA. La régulation de la voie malonique peut donc avoir lieu à deux niveaux: l'acétyl-CoA carboxylase et l'acyl-CoA synthétase. Si la régulation des activités de ces deux enzymes par différents substrats ou coenzymes semble bien établie (73) une régulation hormonale directe de leur synthèse ou de leur activité est mal connue. L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase est diminuée chez le rat à jeun, nourri

avec un régime riche en lipides, ou rendu diabétique par l'alloxane; elle est élevée chez le rat nourri avec un régime pauvre en lipides. L'activité de l'acyl-CoA synthétase hépatique subit les mêmes variations que celle de l'acétyl-CoA carboxylase. L'administration continue d'hydrocortisone à des rats produit une diminution de son activité, alors que des injections de triiodothyronine causent une augmentation de 75-100% de son activité. Ces observations suggèrent une régulation hormonale de l'activité des enzymes lipogéniques dans le foie. C'est ce changement que nous avons voulu étudier en mesurant la lipogenèse dans le foie perfusé de souris obèses, témoins, et obèses rendues relativement déficientes en insuline.

II. MATERIEL ET METHODES

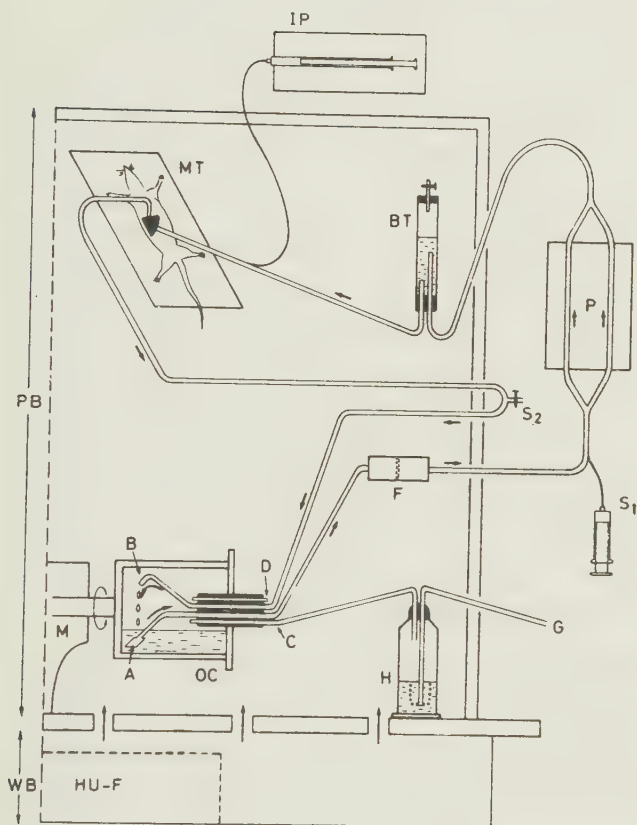
A. DESCRIPTION DE LA PERFUSION

1. Description de l'appareil

Les appareils à perfuser utilisés dans cette étude sont des copies de celui décrit par Exton et Parck (16) qui ont été construites dans l'atelier des Laboratoires. Chaque appareil permet la perfusion simultanée de deux foies. Le Laboratoire possède trois de ces appareils: 6 foies peuvent donc être perfusées simultanément ce qui permet de faire toutes les expériences sur des animaux dans le même état de nutrition.

La figure 2 montre le schéma de l'appareil; celui-ci est formé d'une cage de plexiglas de 120 cm de long, 42 cm de large et 40 cm de hauteur, dans le socle de laquelle se trouve le radiateur qui permet de maintenir la température à 37°C à l'aide d'un thermostat placé près du foie perfusé. La paroi antérieure de la chambre a deux portes qui donnent chacune accès à un des plateaux mobiles sur lequel se trouve l'animal, et qui peuvent glisser hors de la chambre pour l'établissement de la perfusion. Le perfusé est oxygéné dans un tambour rotatif placé 12 cm au dessous du plateau, le mélange $O_2 : CO_2$ (95 : 5) arrive dans ce tambour après avoir été humidifié. Le perfusé est pompé hors du tambour par une pompe péristaltique (modèle 1201, Harvard Apparatus Co. Inc., Millis, Mass.), passe à travers un filtre formé d'un disque de gaze de nylon dont les pores ont 65 μ de diamètre, puis dans un tube de verre destiné à éliminer les bulles d'air qui pourraient s'être formées et arrive au foie par une cannule inférieure placée dans la veine porte. Cette cannule est faite d'une aiguille de 0.9 mm de diamètre coupée à 2.5 cm;

Figure 2: Schéma de l'appareil à perfuser



WB: socle en bois, contenant le radiateur (HU-F); PB: boîte de plexiglas;
M: moteur entraînant le tambour; OC: chambre d'oxygénation; A: sortie
du milieu; C: Arrivée du mélange gazeux, préalablement humidifié en H;
F: filtre; S_1 : prélèvement des échantillons; p: pompe péristaltique;
BT: système de captation de bulles; IP: arrivée de la pompe à infusion;
MT: plateau mobile sur lequel se trouve la souris; S_2 : ouverture du
circuit; B: retour du perfusé dans la chambre d'oxygénation;
D: sortie de l'air.

une gorge est creusée à 3 mm de la pointe, pour serrer un fil sans qu'il puisse glisser le long de l'aiguille.

Le milieu de perfusion quitte le foie par une cannule placée dans la veine cave inférieure et retourne au tambour pour y être ré-oxygéné et mélangé. Le débit est de 3 ml/min soit 2 à 2.5 ml/min/gr. foie ce qui est suffisant pour une oxygénation optimale. Tout le système est constitué de tuyaux de silicone de 2 mm de diamètre intérieur.

Dans les expériences décrites plus loin, 2 types de perfusion sont effectuées. Dans le premier cas, le plus fréquent, le circuit est fermé, ce qui signifie que le perfusat quittant le foie retourne au tambour et recircule pendant toute la durée de la perfusion. On a alors une accumulation de produits dans le perfusat. Des aliquotes (2 ou 3 ml) de milieu de perfusion sont prélevés à intervalles réguliers (généralement toutes les 15 ou 30 minutes) après le tambour (Fig. 2). A la fin de la perfusion, le perfusat est recueilli dans un cylindre gradué et son volume mesuré. Lors des calculs on tient compte de ce volume auquel on ajoute le volume des aliquotes pris pendant la perfusion. Ce système offre deux avantages:

- l'accumulation des produits dans le perfusat rend possible la détermination de ceux d'entre-eux qui ne seraient pas assez concentrés après un seul passage dans le foie pour permettre une détermination précise (exemple: triglycérides, triglycérides nouvellement synthétisés).
- la perfusion en milieu fermé ne nécessite que 50 ml de perfusat pour une expérience de deux heures.

Il offre un désavantage:

- lorsque le perfusat contient un substrat ou lorsqu'une hormone

est infusée, il est difficile de connaître avec précision sa captation ou sa destruction par le foie, on aura de ce fait de légères variations par rapport à la concentration calculée. Lorsque l'expérience nécessite une concentration absolument constante d'un substrat ou d'une hormone, on utilise un système ouvert; le perfusat est recueilli à la sortie du foie après un seul passage dans celui-ci (Fig. 2). Ce système est surtout utilisé pour déterminer la sensibilité à une hormone. On évite alors une accumulation trop importante de l'hormone infusée.

2. Etablissement de la perfusion

La souris est pesée et anesthésiée avec du Nembutal (100 mg/kg) injecté i.p., elle est ensuite placée sur le dos sur le plateau mobile et fixée par les 4 pattes. L'abdomen est largement incisé et les intestins réclinés à droite de façon à mettre en évidence la veine porte et la veine cave inférieure. On passe ensuite une ligature (sans la serrer) autour des quatre vaisseaux suivants:

- a) autour de la veine porte, avant son entrée dans le foie
- b) autour de l'artère mésentérique supérieure et de l'artère hépatique
- c) autour de la veine cave inférieure, entre le bord du foie et la veine rénale droite

Lorsque les ligatures sont placées, les deux tuyaux, celui de l'arrivée et celui du départ du perfusat sont clampés, on établit une légère surpression dans le tuyau qui amène le perfusat au foie. La cannule inférieure est alors introduite dans la veine porte. Immédiatement après l'insertion de la cannule, le clamp est enlevé et la pompe est mise en marche. Comme la cannule supérieure n'est pas encore en place, on fait une incision dans

la veine cave inférieure très bas, pour que le milieu puisse s'échapper. De cette façon la période d'anoxie est réduite à un temps très court (moins de 5-10 secondes) et le foie est perfusé pendant la mise en place de la cannule supérieure. La ligature placée autour de la veine porte est serrée dans la gorge de la cannule; on ferme également la ligature placée autour des artères mésentérique supérieure et hépatique. Le thorax de l'animal est alors ouvert, la cannule supérieure est placée dans la veine cave inférieure, à travers l'oreillette droite. A ce moment on ferme la ligature placée sur la veine cave inférieure entre le bord du foie et la veine rénale droite. Le circuit est dès lors établi: le perfusat quitte le foie par la cannule supérieure; ce moment est considéré comme temps 0. Le plateau mobile est alors glissé à l'intérieur de la chambre et le foie recouvert d'un papier de cellophane humidifié avec du NaCl 0.9% pour éviter son dessèchement. Le canal biliaire n'est pas cannulé lors de la perfusion de foie de souris comme c'est le cas pour le foie perfusé du rat. C'est une opération trop difficile qui peut compromettre la bonne marche de la perfusion et n'offre pas d'intérêt dans le cadre du sujet étudié.

Le temps total nécessaire pour établir la perfusion est en général de 4 à 6 minutes.

B. MILIEU DE PERFUSION

1. Milieu de perfusion utilisé pour l'étude de la gluconéogenèse et de la glucogénolyse

Pour l'étude de la gluconéogenèse et de la glucogénolyse,

le foie est perfusé avec un milieu composé de tampon Krebs-Ringer bicarbonate (45), d'albumine humaine dialysée (3g/100 ml) et de globules rouges lavés, de façon à avoir une hématocrite de 20 dans le perfusat (30 ml de globules rouges lavés et centrifugés ayant une hématocrite de 80%).

L'albumine humaine (Croix-Rouge Suisse, Berne) est dialysée contre 8 volumes d'eau utilisée pendant 30 heures (l'eau est changée 7 fois), ajustée à un pH de 7.4 après dialyse et filtré sur un filtre Sartorius dont les pores ont un diamètre de 45 μ . L'albumine humaine ne contient jamais plus de 0.1 mEq/L d'acides gras. Elle n'est donc pas dégraissée.

Les globules rouges bovins ajoutés au milieu de perfusion pour le transport de l'oxygène sont préparés de la façon suivante: Le sang de boeuf est recueilli et mélangé à 0.2 volumes d'un anticoagulant contenant 13.2 g de citrate de Na, 4.4 g d'acide citrique et 13.2 g de glucose par litre, ainsi que 30 mg de Terramycine pour 2 l. de globules rouges.

Le sang est centrifugé 10 min à 4° et le plasma est éliminé ainsi que les globules blancs à la surface des globules rouges. Les globules sont lavés 3 fois avec 3-4 volumes de NaCl 0.9% et 2 fois avec 3-4 volumes de tampon Krebs-Ringer bicarbonate. Les globules rouges bovins lavés consomment très peu de glucose (5 μ moles/heure pour 50 ml de perfusat) et produisent très peu de lactate (7 μ moles/heure pour 50 ml de perfusat).

2. Milieu de perfusion utilisé pour l'étude de la lipogénèse et la sécrétion de triglycérides

Plusieurs auteurs (70,81) ont montré que la sécrétion de triglycérides par le foie de rat perfusé ne se fait que si le

milieu de perfusion contiènt du sérum de rat. Le foie de souris perfusé avec le milieu décrit dans le paragraphe précédent ne produit que des quantités très faibles de triglycérides. Il était hors de question de collecter du sérum de souris, du sérum bovin semblait indiqué. Pour en éliminer les acides gras, le sérum bovin, après filtration est dégraissé selon la méthode décrite par Chen (11) pour l'albumine. Le sérum est amené à un pH de 3.5 avec HCl 4 N et agité pendant 2 heures à 4° avec 3.5 g/100 ml de charbon actif, puis centrifugé. Le surnageant est filtré à travers des filtres Sartorius dont les pores vont de 3 μ à 0.15 μ pour enlever le plus possible de particules de charbon. Le sérum est alors amené à pH 7.4 et dialysé pendant 24 heures contre 10 volumes de tampon Krebs-Ringer changé 3 fois. Ce traitement enlève non seulement les acides gras contenus dans le sérum bovin mais probablement aussi certains facteurs de coagulation. En effet, si le sérum n'a pas été traité, le foie perfusé gonfle rapidement, ce qui rend impossible la poursuite de la perfusion. Pour cette série d'expériences nous avons utilisé de l'albumine bovine, celle-ci devait être préalablement dégraissée par un traitement semblable à celui du sérum bovin. La dialyse se fait contre de l'eau distillée.

Le milieu utilisé pour l'étude de la lipogénèse et de la sécrétion de triglycérides a ainsi la composition suivante:

- 25 ml/100 ml de sérum bovin traité
- 30 ml/100 ml de globules rouges lavés (hématocrite 80%)
- 1,5 g/100 ml d'albumine bovine traitée
- 55 ml/100 ml de tampon Krebs-Ringer bicarbonate

Dans certaines expériences, des acides gras sont ajoutés au perfusat sous forme liée à l'albumine. De l'oléate, sous forme de sel sodique est ajouté goutte à goutte à une solution d'albumine 14%,

continuellement agitée et maintenue à 40°C dans un bain-marie. A la fin de l'opération, la solution doit être claire, elle contient alors 15 μ moles/ml d'oléate qui sera diluée de façon appropriée dans le perfusat.

C. ANALYSES DU FOIE

1. Glycogène (30)

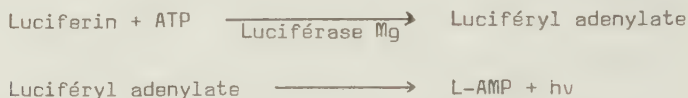
A la fin de la perfusion, un fragment de foie de 200-500 mg est pesé, placé dans un tube gradué contenant 2 ml de KOH 30% et digéré pendant 2 heures dans un bain-marie à 80°C. Le glycogène est précipité par adjonction d'éthanol absolu (en quantité nécessaire pour avoir une concentration finale d'éthanol de 50%). La solution est amenée à 75° pour précipiter le glycogène puis refroidie. Après centrifugation, aspiration du surnageant, le glycogène est remis en suspension dans 2 ml d'éthanol 65% et précipité à nouveau à 75°C. On ajoute 2 ml de H₂SO₄ 2N au précipité de glycogène après qu'il ait été centrifugé et que le surnageant ait été aspiré. Le glycogène est hydrolysé pendant 4 heures à 90°. La solution est neutralisée avec NaOH 2N, amenée à un volume connu par addition de tampon phosphate 0.1 M pH 7. Le glucose est alors déterminé. Le contenu en glycogène est exprimé en mg glucose/g foie.

2. ATP (6,67)

A la fin de la perfusion, un morceau de foie de 200 mg environ est immédiatement placé dans une pince préalablement

refroidie dans l'azote liquide, pesé et placé dans un tube contenant 2 ml HClO_4 1 N. Il est soniqué pendant 10 sec (Sonifier B-12 Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut) et centrifugé. Le surnageant est dilué 1 : 30 dans du tampon glycine pH 11 (glycine 0.1 M, NaOH 0.1 M) et congelé jusqu'au moment de la détermination.

Principe:



L'émission de lumière est proportionnelle à la concentration d'ATP, elle est mesurée dans un compteur à scintillation liquide pendant 0.1 min. (Packard Tricarb Model 3380, Instrument Inc. Downers Grove, Illinois) dans le 1^{er} canal, le compteur étant mis hors de coïncidence.

Mesure:

La solution d'enzyme (luciférase) est préparée en ajoutant 15 mg/100 ml d'un extrait de lucioles (Sigma Chemical, St. Louis Missouri) à un tampon arsenate 0.033 M ajusté à pH 7.5 contenant 0.02 M MgSO_4 . La solution est agitée pendant 90 min. en chambre froide; 5 ml de solution enzymatique sont placés dans des fioles de comptage. Un aliquot de 50 μl d'extrait dilué est ajouté et l'émission de lumière est mesurée exactement 30 sec après l'adjonction d'extrait, pendant 0.1 min. Une courbe standard est faite avec chaque série de déterminations.

Les inconnues sont calculées sur la courbe standard multipliées par la dilution et rapportées au gramme de foie.

3. Triglycérides hépatiques (24,47)

A la fin de la perfusion, des morceaux de foie de 350-400 mg sont placés dans 20 volumes de chloroforme méthanol 2 : 1 (v/v) et soniqués. Le lendemain, l'extrait est filtré dans des tubes gradués. A un volume connu (en général 5 ml) on ajoute 1/5 d'eau, on mélange, centrifuge et aspire la phase supérieure, l'extrait est ensuite lavé 3 fois avec 2 ml de solution de lavage (470 ml H_2O , 480 ml méthanol, 30 ml chloroforme, 260 mg $CaCl_2$). Après lavage, le volume est ajusté au volume initial avec du méthanol. 1 ml (correspondant à 50 mg de foie) est transféré dans un tube contenant environ 75 mg de zéolite activée, le tout est agité, centrifugé pour sédimenter la zeolite; 20 μ l (correspondant à 1 mg de foie) sont placés dans de petits tubes et séchés. La saponification et la détermination du glycérol se font de la même manière que pour les triglycérides du perfusat. Les résultats sont exprimés en μ mol/g foie.

4. Lipides hépatiques marqués

Après lavage des extraits de foie, les 4 ml non utilisés précédemment sont séchés, saponifiés 90 min à 75° avec 3 ml d'une solution alcoolique contenant 0.5 N KOH. L'insaponifiable est extrait 3 fois avec 3 ml d'éther de pétrole placé dans des fioles de comptages et séché. 10 ml de liquide de scintillation sont ajoutés, et les fioles sont comptées dans un compteur à scintillation liquide. L'extrait de foie est ensuite acidifié et les acides gras sont extraits 3 fois avec 3 ml d'éther de pétrole et traités de la même façon que l'insaponifiable. On utilise comme blancs des foies ayant été 30 sec en contact avec

la radioactivité. Les valeurs des blancs indiquent toujours que le lavage a enlevé plus de 99.99% de l'eau tritiée contenue dans les extraits de foie, et 99.0% du U-¹⁴C-pyruvate.

Les cpm obtenus sont rapportés au gramme de foie et divisés par l'activité spécifique du précurseur (³H ou U-¹⁴C-pyruvate). La lipogénèse est exprimée en μ atom H⁺/g foie ou en μ mole pyruvate/g foie.

D. ANALYSE DU PERFUSAT

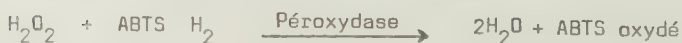
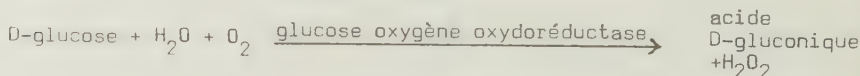
Des aliquots de milieu de perfusion (2 à 3 ml) sont pris à intervalles réguliers (15 ou 30 min) 0.5 ml sont ajoutés à 0.5 ml d'acide perchlorique 1 N pour être déprotéinisés.

Le milieu non déprotéinisé est centrifugé: les analyses suivantes sont faites dans le surnageant: glucose, triglycérides, acides gras, urée, triglycérides nouvellement synthétisés. Selon le sujet étudié, l'une ou plusieurs de ces analyses ne sont pas faites.

Le milieu déprotéinisé, après centrifugation, est utilisé pour la mesure de lactate, pyruvate, β -hydroxybutyrate, acétoacétate, glycérol.

1. Glucose

Principe:



La substance chromogène, ABTS (2,2'-Azino-di-(3 éthylbenzthiazolon)-6'-sulfonate) a une très grande sensibilité et offre l'avantage d'être stable à la lumière et non autooxydable.

Mesure:

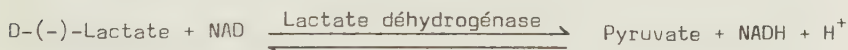
Le glucose est déterminé à l'aide des solutions contenues dans le coffret Boehringer (15156 Boehringer, Mannheim) soit

- la glucose oxygène oxydoréductase 120 mg/L
- la substance chromogène ABTS (1 g/L)
- la peroxydase (40 mg/L)

3 ml de solution d'enzymes sont ajoutés à 10 µl de perfusat non déprotéinisé. La densité optique est lue à 625 nm sur un spectrophotomètre. Des standards de 75, 150 et 300 mg/100 ml sont faits avec chaque série de déterminations.

2. Lactate, Pyruvate

a) Lactate; Principe (38):



La réaction est fortement déplacée vers la droite grâce à l'hydrazine contenue dans le tampon qui capte le pyruvate formé, et grâce au milieu alcalin.

On mesure le changement de densité optique (ΔOD) à 340 nm, proportionnel à la quantité de lactate. Une courbe standard allant de 0.5 à 2 µmole/ml est toujours faite en même temps que les inconnues.

Mesure:

50 µl de perfusat déprotéinisé (ou de solution standard) sont ajoutés à 1.7 ml de tampon glycine (500 mM glycine) pH 9.0

contenant 400 mM d'hydrazine, et 1.5 mM NAD. La densité optique OD1 est mesurée sur un spectrophotomètre, 10 µl de lactate déhydrogénase sont ajoutés, la densité optique OD2 est mesurée à nouveau 30 min, après adjonction de l'enzyme. La différence de densité optique $\Delta OD = OD2 - OD1$ est utilisée pour le calcul de la concentration

$$X \text{ } \mu\text{mole/ml} = \frac{(\Delta OD - \Delta OD \text{ blanc}) \text{ dilution}}{(\Delta OD \text{ standard } 1 \text{ } \mu\text{m/ml} - \Delta OD \text{ blanc})}$$

b) Pyruvate; Principe (55):



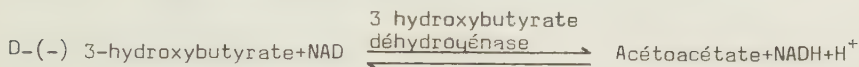
Les concentrations de pyruvate dans le perfusat sont en général assez faibles, c'est pourquoi il est mesuré par fluorimétrie (Aminco Microfluorimelox, American Instrument Co, Inc. Silver Spring, Md.), en même temps qu'une courbe standard allant de 250 à 62.5 nmole/ml. La réaction est déplacée quantitativement vers la droite.

Mesure:

10 µl de perfusat déprotéinisé (ou de solution standard) sont ajoutés à 1 ml de tampon phosphate (0.1 M) pH 7.0 contenant 3 nm/ml de NADH. La fluorescence F1 est mesurée (filtre primaire 340 nm, filtre secondaire 470 nm) et enregistrée, 6 min. après adjonction de 10 µl de LDH diluée 1 : 100 la fluorescence F2 est mesurée à nouveau et enregistrée sur le même graphique. La concentration de pyruvate est calculée d'après la tangente de la courbe standard, multipliée par la dilution.

3. β -hydroxybutyrate et acétoacétate (corps cétoniques)

a) β -hydroxybutyrate; Principe (78):

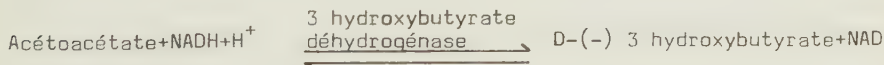


Cette détermination est également faite par fluorimétrie (voir pyruvate). La constante de la réaction $K = 1,45 \times 10^{-9}$ à 25° . A pH 8.5, 40% du β -hydroxybutyrate est oxydée en acétoacétate. La réaction est rendue quantitative par adjonction d'hydrazine dans le tampon, qui capte l'acétoacétate formé.

Mesure:

10 μl de perfusat déprotéinisé sont ajoutés à 1 ml de tampon (Tris 25 mM, pH 8.5) contenant 0.25 M d'hydrazine et 0.65 mM $\text{Na}_2\text{-H}_2$ - EDTA ainsi que 0.2 mM NAD. On mesure F 1, ajoute 5 μl de β -hydroxybutyrate déhydrogénase, incube 20 min. à 30° et mesure F 2. Une courbe standard allant de 200 à 800 nmole/ml est faite en même temps que chaque série de déterminations. Le calcul de la concentration est le même que pour le pyruvate.

b) Acétoacétate; Principe (51):



A un pH = 7, la réaction est déplacée quantitativement vers la droite (98% de l'acétoacétate est réduit).

Mesure:

10 μl de perfusat déprotéinisé sont ajoutés à 1 ml de tampon phosphate (0.1 M pH 6.8) contenant 5 nmole/ml de NADH. On mesure F_1 , ajoute 10 μl de β -hydroxybutyrate déhydrogénase et

mesure F 2 après 20 min.

Une courbe standard allant de 93,7 à 375 nmole/ml est faite pour chaque série de détermination. Le calcul de la concentration est le même que pour le pyruvate.

4. Urée

Principe (5):



La production d'indophénol est proportionnelle à la quantité d'urée. L'intensité de la couleur bleue de l'indophénol peut être déterminée spectrométriquement entre 530 et 650 nm avec un maximum à 630 nm. La réaction se fait à 37°, elle est totale après 20 - 30 min.

Mesure:

L'urée du perfusat est déterminée à l'aide des coffrets Boehringer (n° 15930 THAC Boehringer, Mannheim) qui contiennent:

- la solution d'uréase (2 mg/ml dans du glycérol 50%)
- la solution de phénol (0,106 M)-nitroprussiate de sodium (0,17 mM)
- la solution d'hypochlorite (11 mM).

A 100 µl de perfusat non déprotéinisé on ajoute 100 µl de la solution d'uréase, le mélange est incubé 15 min. à 37°, 5 ml de la solution de phénol et 5 ml de la solution d'hypochlorite sont ajoutés, le mélange est incubé 30 min à 37°, à la fin de la

réaction, la densité optique est lue sur un spectrophotomètre, à 627 nm. Une courbe standard allant de 30 à 120 mg/100 ml est faite en même temps que chaque série de déterminations.

5. Acides gras libres

Principe (14,37):

Les acides gras sont extraits par le mélange d'extraction décrit par Dole (40 parties d'isopropanol, 10 parties d'heptane distillé et 1 partie de H_2SO_4 1N). Après avoir laissé reposer le mélange on ajoute de l'heptane et de l'eau ce qui produit 2 phases; une phase supérieure (heptane et isopropanol) contenant les acides gras et une phase inférieure aqueuse.

Un aliquot de la phase supérieure est transféré dans de petite tubes et séchée. Les acides gras sont remis en solution dans du chloroforme-heptane (8 : 7 v/v). Un aliquot est transféré dans des tubes plastiques coniques (de 300 μ l de contenance) dans lesquels on ajoute 10 μ l d'une solution aqueuse de Nickel radioactif (^{63}Ni). Le nickel complexe les acides gras, une molécule de nickel se lie à deux molécules d'acides gras. L'excès de nickel reste dans la phase aqueuse au fond du tube. Un aliquot de la phase supérieure est transféré dans des fioles de comptage. Une courbe standard de palmitate allant de 25 à 500 nmole/ml est faite avec chaque série de déterminations.

Mesure:

A 0.2 ml de perfusat non déprotéinisé on ajoute 2 ml de solution d'extraction décrite par Dole. Après agitation, on laisse reposer 30 min, puis on ajoute 1.6 ml d'heptane et 1.0 ml d'eau. 1 ml de la phase supérieure (heptane et isopropanol) est

transféré dans de petits tubes et séché. Au moment de la détermination des acides gras, ceux-ci sont remis en solution dans 0.5 ml de chloroforme-heptane (8 : 7 v/v). 200 µl de cette solution sont transférés dans de petits tubes plastiques. On fait de même avec les standards de palmitate.

Préparation de la solution de ^{63}Ni

Solution 1:

145,5 mg de Ni (NO_3). $6\text{H}_2\text{O}$ mis en solution dans 0.4 ml d'acide acétique glacial + 5 ml de Na_2SO_4 saturé ad 50 ml avec Na_2SO_4 saturé. La solution contient 10 µm/ml de Ni (NO_3) $_2$.

La solution de nickel radioactif est faite en ajoutant 0.4 ml de solution radioactive de Nickel [^{63}Ni (NO_3) $_2$ dans 0.1 M HNO_3 , 1 mC/ml, 219125 The Radiochemical Center, Amersham] à 10 ml de la solution de nickel froid.

La solution de nickel se conserve.

Solution 2: (à faire le jour de la détermination)

2.8 ml de K_2SO_4 saturé. 0.5 ml de triethanolamine, agiter vigoureusement, centrifuger une minute. La solution de nickel qu'on ajoute aux 200 µl de chloroforme-heptane est faite de parties égales de solution 1 et de solution 2. 10 µl de ce mélange sont ajoutés à chaque petit tube plastic. Le bouchon est fermé et chaque petit tube est agité pendant exactement 30 secondes. Il est alors centrifugé 3 min. La goutte de solution aqueuse contenant le surplus de Nickel se trouve donc dans la partie inférieure du tube. Le bouchon est coupé et 50 µl de la phase supérieure sont transférés dans une fiole de comptage avec 10 ml de solution de scintillation. La radioactivité est comptée dans un spectromètre à scintillation Packard. Le calcul

de la concentration est fait par rapport à la courbe standard.

6. Triglycérides

Principe (47):

Les triglycérides du perfusat sont extraits dans 5 volumes de chloroforme-méthanol 2 : 1 (v/v) (24), de la zéolite activée (4 heures à 120°) est ajoutée en vue d'adsorber les phospholipides. Un aliquot de la phase chloroformique est séché, saponifié. Le glycérol est déterminé enzymatiquement par fluorimétrie après élimination des acides gras.

Mesure:

A 0.2 ml de perfusat non déprotéinisé, on ajoute 2 ml de chloroforme-méthanol 2 : 1 (v/v), 10 mg de zéolite et 0.2 ml d'eau. Le mélange est agité vigoureusement. Le lendemain, après centrifugation, la phase supérieure est aspirée, un aliquot de la phase chloroformique (0.5 ml) est transféré dans de petits tubes (8 mm ø; 80 mm haut) et séché, on ajoute 0.5 ml d'un mélange:

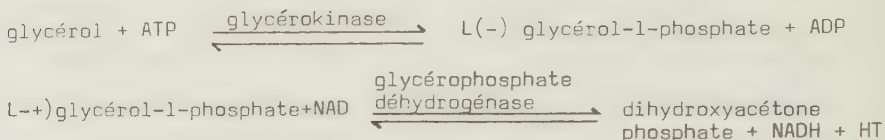
- KOH 25%, 11,2 ml
- isopropanol 35 ml
- éthanol absolu ad 100 ml

Les extraits sont saponifiés 40° à 75°. Une courbe standard de tripalmitine est faite en même temps que chaque groupe de déterminations, cette courbe va de 2.5 à 25 nmole/tube. Comme les acides gras en grande quantité interfèrent avec la détermination du glycérol, soit en produisant une turbidité dans le milieu, soit en inhibant la glycérokinase, ceux-ci sont précipités par 0.5 ml de $MgSO_4$ 0.3N après la saponification. Après centrifugation, le surnageant est transféré dans des tubes contenant 0.8 ml de

chloroforme afin d'éliminer la plupart des acides gras restants. 100 µl de la phase supérieure sont utilisés pour la détermination enzymatique du glycérol.

Détermination enzymatique du glycérol (47)

Principe:



L'équilibre est déplacé vers la droite en travaillant à pH 9.8 et en captant le dihydroxyacétone phosphate par l'hydrazine contenue dans le tampon. On mesure l'apparition de NADH après adjonction de glycérokinase.

Mesure:

Le tampon utilisé pour la détermination du glycérol a la composition suivante:

- 0.137 M glycine
- 0.69 M hydrazine
- 1.37 mM MgCl_2
- pH ajusté à 9.8 avec KOH 10 N

Lors de la mesure du glycérol on prépare un mélange enzymatique contenant (pour 10 dosages):

- 10 ml de tampon hydrazine
- 0.5 mg NAD
- 3.5 mg ATP
- 0.05 ml glycérophosphate déhydrogénase (10 mg/ml)

Pour la détermination on ajoute 1 ml de mélange enzymatique à 100 µl de la phase supérieure mentionnée. La fluorescence F 1 est lue et enregistrée. 10 µl de glycérokinase (1 mg/ml diluée 1 : 20 avec $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 2.2 M) sont ajoutés. Après 30 minutes on

lit et enregistre la fluorescence F_2 . Le calcul de la concentration se fait à partir de $\Delta F = F_2 - F_1$. Les dosages sont comparés à la courbe standard.

7. Triglycérides (acides gras) marqués

A la fin de la perfusion, le perfusat restant est recueilli, centrifugé. A 4 ml du surnageant on ajoute 20 ml de chloroforme méthanol 2 : 1 (v/v) on agite vigoureusement et laisse reposer 1 jour. L'extrait est filtré, le surnageant est aspiré, 8 ml de l'infranatant sont transférés dans des tubes et lavés 4 fois avec du "solvent upper phase" (voir E,3) après le dernier lavage, l'extrait chloroformique est séché, saponifié 90' à 75°, dans de l'éthanol contenant 0.5 N KOH, les acides gras sont extraits par l'éther de pétrole après acidification (voir E,3); on omet l'extraction de l'insaponifiable, celui-ci étant négligeable dans le perfusat.

Un blanc est traité de la même façon que le perfusat. Il s'agit de perfusat n'ayant pas passé dans le foie, contenant également le précurseur marqué.

L'incorporation d'eau tritiée dans les acides gras du perfusat est exprimée en $\mu\text{atom H}^+/\text{g}$ foie et calculée de la façon suivante:

$$\frac{(\text{cpm/ml perfusat-blanc}) \times \text{volume final} + 6}{\text{activité spécifique H}^+ \times \text{poids du foie en g}}$$

L'activité spécifique de H^+ est obtenue en comptant 10 μl de perfusat, en se basant sur une concentration d'eau de 53 M.

L'activité spécifique de l'eau ne varie pas au cours de la perfusion.

8. Glucose marqué

0.5 ml de perfusat sont déprotéinisés avec 0.5 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 0,3N 0.5 ml ZnSO_4 5%, 1 ml d'eau. Après centrifugation, 1 ml du surnageant est ajouté à un mélange de résines, 100 mg Dowex-50 x 8 (forme H^+ , 200-400 mesh) et 400 mg d'Amberlite MB-3 (forme OH^- , 10-50 mesh) placé dans des tubes de 10 ml. Le mélange résine-surnageant est agité vigoureusement, laissé 30 min. et centrifugé. Un aliquot du surnageant est transféré dans des fioles de comptage avec 10 ml de solution de Bray (7). La radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation.

Avec chaque groupe d'échantillons on traite un blanc, contenant uniquement le lactate (ou pyruvate) marqué et un échantillon contenant du glucose marqué. Ce traitement élimine au moins 98% du pyruvate (ou du lactate). La récupération du glucose marqué est d'au moins 85% (généralement 90%).

Le calcul de l'incorporation du précurseur en glucose est donc:

$$\mu\text{mole précurseur/min/g} = \frac{(\text{cpm-}^{14}\text{C-glucose} - 61) \times \text{rendement} \times \text{débit/min}}{\text{activité spécifique} \times \text{poids du foie}}$$

9. CO_2 marqué

L'oxydation de pyruvate uniformément marqué en $^{14}\text{CO}_2$ est mesurée dans des expériences en circuit ouvert. Le milieu qui quitte le foie est collecté dans des tubes fermés par un bouchon en caoutchouc auquel est pendu une cupule contenant un morceau de papier filtre inhibé de NaOH 1N.

Le tuyau provenant du foie est terminé par une aiguille qu'on pique à travers le bouchon, récoltant ainsi le perfusat

pendant un temps déterminé (2 min.) 2 ml de H_2SO_4 1 N sont alors ajoutés pour libérer le CO_2 qui se fixe sur le papier filtre contenant le NaOH. 1 heure après, le papier est séché, compté dans du toluène POPOP en même temps que des blancs, faits avec le même perfusât, mais n'ayant pas passé dans le foie.

E. A N I M A U X

Les souris utilisées dans la première partie de l'étude sont des souris suisse albinos, mâles, nourries ad libitum avec de l'Altromin R. Au moment de leur utilisation les souris étaient âgées de 6 semaines, elles étaient soit nourries soit à jeun depuis 12 heures, ce qui signifie que la nourriture leur était enlevée la veille à 20 h, 2 heures après l'extinction de la lumière de l'animalerie. Comme les souris mangent plus lorsque l'animalerie est dans l'obscurité, on peut supposer que toutes les souris avaient mangé au moment où la nourriture leur était enlevée.

Pour la deuxième partie de l'étude nous avons utilisé des souris mâles obèses (C57 BL/6J ob/ob) produites aux Jackson Memorial Laboratories, Bar Harbor, Maine. Les contrôles non obèses (C57 BL/6J) étaient produits ici à partir de parents provenant des Jackson Memorial Laboratories. Toutes les souris sont nourries ad libitum et utilisées entre 8 et 12 semaines. Les souris obèses rendues relativement déficientes en insuline par l'injection de streptozotocine sont traitées de la façon suivante: après 24 heures de jeûne on leur injecte i.p. 220 mg/kg de streptozotocine diluée dans NaCl 0.9% et acidifiée à pH 4 avec

de l'acide citrique 0.05 M. Le groupe contrôle est traité de la même façon excepté qu'il ne reçoit pas de streptozotocine. Les souris sont utilisées 7-10 jours après ce traitement.

F. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats de la première partie de ce travail sont exprimés en $\mu\text{mole}/100 \text{ g}$ d'animal. La proportion entre le poids du foie et celui de l'animal est constante. Le foie représente $4,74 \pm 0,08\%$ ($n=30$) du poids de l'animal à jeun et $5,21 \pm 0,09\%$ ($n=15$) du poids de l'animal nourri.

Dans la deuxième partie du travail, les résultats sont reliés au gramme de foie, en effet, le foie des souris obèses est hypertrophié et représente un plus grand pourcentage du poids de l'animal.

III. R E S U L T A T S

PARTIE I

La gluconéogenèse et la glycogénolyse, ainsi que certains aspects de la régulation respective de ces processus, ont été étudiées, utilisant le foie perfusé, chez la souris albinos mâle.

1. Gluconéogénèse en présence de substrats à des concentrations sub-maximales

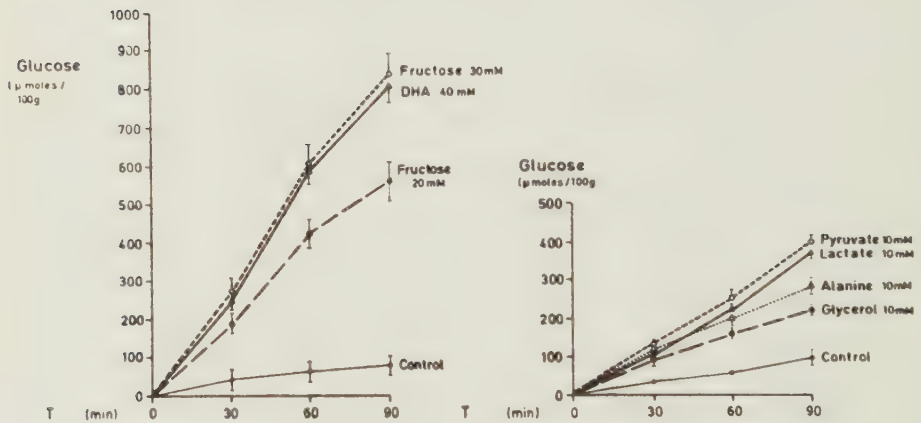
Le but de ces expériences est de déterminer la capacité maximum de synthèse de glucose à partir de différents substrats, par le foie perfusé de souris à jeun depuis 12 heures.

La figure 3 montre la production de glucose en fonction du temps en l'absence et en présence des substrats utilisés à différentes concentrations. En l'absence de substrat, le foie perfusé produit une faible quantité de glucose qui peut provenir soit du glycogène résiduel (après 12 heures de jeûne le foie de souris contient moins de 1 mg glucose/g foie), soit de la dérivation de substrats endogènes ou du lactate produit, bien qu'en très faible quantité, par les globules rouges.

Les substrats rejoignant la voie gluconéogénique au delà du phosphoénolpyruvate (par exemple le fructose ou le dihydroxyacétone) produisent les plus grandes quantités de glucose (jusqu'à 500 μ moles/100 g/h). Ceux qui rejoignent la voie gluconéogénique en deçà du phosphoénolpyruvate (le lactate, le pyruvate, l'alanine ou le glycérol) produisent considérablement moins de glucose. Le lactate et le pyruvate, utilisés à concentration égale, produisent la même quantité de glucose. L'alanine et le glycérol (10 mM) sont

Figure 3

Gluconéogénèse par le foie perfusé de souris à jeun: effet de différents substrats



Foies perfusés en recirculation. Les substrats sont ajoutés dans le réservoir au temps 0. Souris à jeun 12 heures. Chaque point est la moyenne de 3 - 6 expériences $\pm$ S.E.

Tableau 2

Effet de différents substrats sur la gluconéogénèse et la cétogénèse par le foie perfusé de souris à jeun

Substrats	N	Glucose produit $\mu\text{mole}/100 \text{ g/h}$	Corps cétoniques produits $\mu\text{mole}/100\text{g/h}$	Substrat capté $\mu\text{mole}/100 \text{ g/h}$	Urée produite $\mu\text{mole}/100 \text{ g/h}$	Glycoqène $\mu\text{mole}/100\text{g}$
0	7	39 $\pm$ 5	283 $\pm$ 24		25 $\pm$ 33	2,6 $\pm$ 0,5
Lactate 10 mM	8	314 $\pm$ 21	101 $\pm$ 27	751 $\pm$ 60		2,6 $\pm$ 0,5
Lactate 10 mM + glucose 5.6 mM	4	299 $\pm$ 9				10,5 $\pm$ 5,2
Pyruvate 5 mM	4	266 $\pm$ 31	95 $\pm$ 32	847 $\pm$ 62		
Pyruvate 10 mM	7	335 $\pm$ 17	98 $\pm$ 12	855 $\pm$ 53		2,6 $\pm$ 0,5
Pyruvate 20 mM	4	326 $\pm$ 33	60 $\pm$ 22			7,9 $\pm$ 5,2
Alanine 10 mM	4	142 $\pm$ 28	98 $\pm$ 22		107 $\pm$ 12	26 $\pm$ 16
Glycérol 10 mM	3	127 $\pm$ 10		432 $\pm$ 26		
Dihydroxyacétone 40 mM	4	568 $\pm$ 45	157 $\pm$ 40			50 $\pm$ 16
Fructose 20 mM	4	368 $\pm$ 44	116 $\pm$ 15			208 $\pm$ 61
Fructose 30 mM	3	574 $\pm$ 40				168 $\pm$ 50

Foies perfusés en recirculation. Les substrats sont ajoutés dans le réservoir au temps 0.

Souris à jeun 12 - 14 heures.

de moins bons substrats glucoformateurs que le lactate et le pyruvate (Tableau 2).

La concentration de lactate et de pyruvate qui produit une gluconéogénèse maximale se situe entre 5 et 10 mM. La présence de glucose dans le perfusat ne modifie pas de façon significative la gluconéogénèse à partir de lactate (Tableau 2).

Le foie perfusé provenant de souris soumises au jeûne produit de grandes quantités de corps cétoniques, bien que le perfusat ne contienne pas d'acides gras, indiquant que les corps cétoniques proviennent de l'oxydation des acides gras endogènes dont le foie de souris à jeun est riche.

L'adjonction de substrats glucoformateurs diminue la production de cétones, comme le montre le tableau 2.

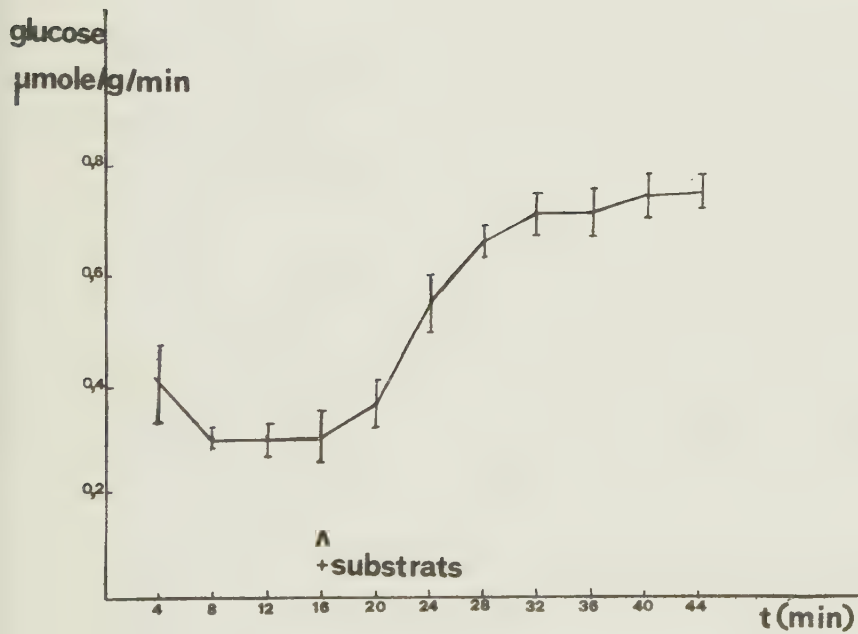
2. Gluconéogénèse à partir de substrats à des concentrations physiologiques

La concentration des substrats utilisés dans les expériences précédentes ne permet que de déterminer la capacité gluconéogénique maximale du foie perfusé de souris. Nous avons voulu mesurer également la production de glucose à partir d'un mélange de substrats à des concentrations physiologiques.

La figure 4 montre la production de glucose par des foies perfusés d'animaux à jeun depuis 12 heures, auxquels on infuse les substrats suivants à des concentrations physiologiques (concentrations existant chez l'animal à jeun): lactate 1 mM, pyruvate 0.1 mM, glycérol 0.3 mM, alanine (représentant les acides aminés) 0.3 mM. Pour éviter une accumulation de substrats, l'expérience a été effectuée en circuit ouvert. Après 20 minutes d'équilibration, le mélange de substrats est infusé directement

Figure 4

Gluconéogénèse par le foie perfusé de souris à jeun: effet de substrats à des concentrations physiologiques.



Foies perfusés en circuit ouvert. Les substrats sont infusés après 20 min. de perfusion. Souris à jeun 12 heures.

Moyenne de 3 expériences $\pm$ S.E.

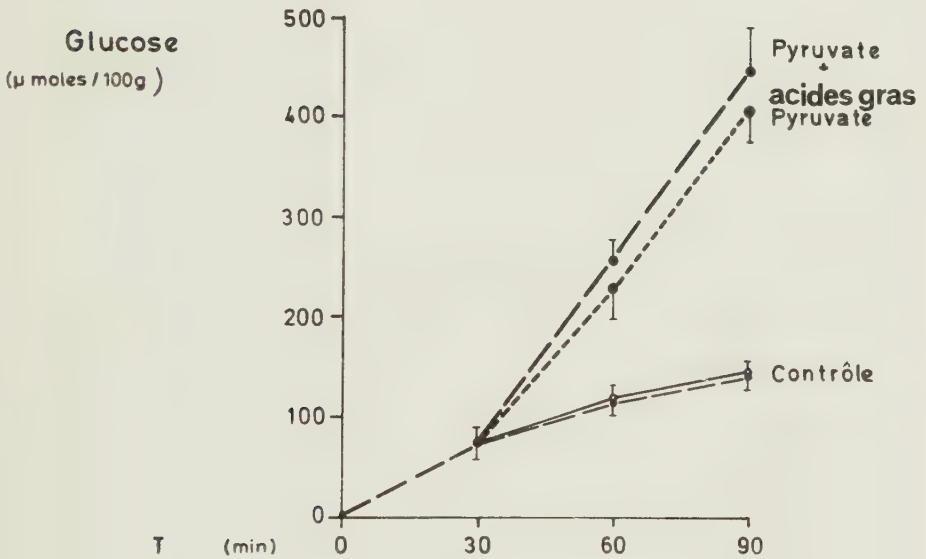
dans la veine porte et, quelques minutes plus tard, la production de glucose augmente et se maintient à un plateau pendant la durée de la perfusion.

3. Absence d'effet des acides gras sur la gluconéogénèse

Plusieurs groupes de chercheurs, travaillant sur le foie perfusé de rat, ont décrit une action stimulatrice des acides gras exogènes sur la gluconéogénèse à partir de lactate, de pyruvate ou d'alanine (64,69,76). Nous avons voulu vérifier si l'effet des acides gras sur la gluconéogénèse était également présent dans le foie perfusé de la souris. La figure 5 permet de voir qu'un tel effet n'est pas observé en présence de pyruvate 10 mM et d'oléate 1.5 mM. On observe la même absence d'effet stimulateur des acides gras si le lactate est utilisé comme précurseur de la gluconéogénèse, et ceci bien que les acides gras soient captés et oxydés (Tableau 3). La mesure de la production basale de corps cétoniques par le foie de la souris suggère que cet organe pourrait être le siège d'une importante oxydation d'acides gras. En effet, la cétogénèse mesurée dans le foie perfusé de souris est, selon les cas, deux à cinq fois (79) plus élevée que celle observée chez le rat. Nous avons donc essayé de diminuer l'oxydation des acides gras, dérivant des triglycérides endogènes, en inhibant la lipase hépatique afin de voir si, dans ces conditions, nous avions une diminution de la gluconéogénèse et si cette diminution pouvait être levée par l'apport d'acides gras dans le perfusat. Ceci constituait une manière de montrer que l'oxydation des acides gras était nécessaire à la gluconéogénèse mais que, dans des conditions normales, celle-ci ne constituait pas une étape limite.

Figure 5

Gluconéogénèse par le foie perfusé de souris à jeun: effet des acides gras.



Foies de souris à jeun (12-14 h) perfusés en recirculation. A 30 minutes, le pyruvate (10 mM) est ajouté dans le tambour et les acides gras sont infusés de façon à obtenir une concentration de 1 mM.

Chaque point est la moyenne de 4-5 expériences.

Effet des acides gras et de la glycodiazine sur la gluconéogenèse et la cétogénèse dans le foie perfusé de souris à jeun.

Additions et concentrations	N	Glucose produit $\mu\text{mole}/100 \text{ g/h}$	Cétogénèse $\mu\text{mole}/100 \text{ g/h}$	Acides gras captés $\mu\text{mole}/100 \text{ g/h}$	$\frac{-C_3}{+C_6}$	Uréogénèse $\mu\text{mole}/100 \text{ g/h}$
0	7	74 ± 7	194 ± 23	---	---	$43 \pm 3,3$
Oléate 1 mM	3	76 ± 3	277 ± 14	101 ± 6	---	$38 \pm 3,2$
Glycodiazine 7.5 mM	6	51 ± 4	40 ± 16	---	---	$53 \pm 6,5$
Pyruvate 10 mM	13	320 ± 17	46 ± 10	---	$3,0 \pm 0,5$	$38 \pm 7,0$
Pyruvate 10 mM + oléate 1 mM	6	345 ± 32	68 ± 17	69 ± 11	---	$40 \pm 3,5$
Pyruvate 10 mM + glycodiazine 7.5 mM	15	248 ± 15	14 ± 4	---	$3,5 \pm 0,2$	$36 \pm 6,5$
Pyruvate 10 mM + glycodiazine 7.5 mM + oléate 1 mM	5	299 ± 17	63 ± 22	68 ± 9	$3,2 \pm 0,3$	$42 \pm 6,5$

Foies de souris à jeun depuis 12 heures perfusés en recirculation pendant 90 minutes. La glycodiazine est ajoutée dans le tambour au temps 0. Le pyruvate et l'oléate à 30 minutes.

4 comparé à 6 $p < 0.01$

6 comparé à 7 $p < 0.05$

Valeurs $\pm$ S.E.

La lipase hépatique a été inhibée par la glycodiazine (7.5 mM) (34) et la gluconéogénèse, à partir de pyruvate a été mesurée. Comme on peut le constater, l'inhibition de la lipase hépatique par cette substance a pour résultat une diminution de 80% de la production de corps cétoniques (Tableau 3). Cependant, dans ce cas, l'inhibition de la gluconéogénèse n'est que de 25 - 30%. L'adjonction d'oléate dans le perfusat restaure partiellement la gluconéogénèse. On voit également que la glycodiazine 7.5 mM ne modifie pas la production d'urée, ce qui n'est pas le cas si elle est utilisée à des concentrations plus élevées (10 mM).

4. Absence d'effet des hormones (glucagon, adrénaline) et de l'AMP cyclique sur la gluconéogénèse

Dans le foie perfusé de rat, il a été démontré que le glucagon, l'adrénaline et l'AMP cyclique exercent une action stimulante sur la gluconéogénèse en accélérant une étape métabolique située entre le pyruvate et le phosphoénolpyruvate (19,20,26) probablement au niveau de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (71). L'action de glucagon, de l'adrénaline et de l'AMP cyclique sur la gluconéogénèse a également été étudiée dans le foie perfusé de souris à jeun depuis 12 heures. Le tableau 4 résume les résultats obtenus en utilisant le pyruvate 10 mM ou le lactate 10 mM comme précurseur. Comme on peut le voir, ni le glucagon (10^{-9} M), ni l'adrénaline (10^{-7} M), ni l'AMP cyclique (10^{-4} M) n'augmentent de façon significative la gluconéogénèse à partir de pyruvate. On obtient des résultats similaires avec le lactate 10 mM comme précurseur et le glucagon (10^{-9} M). L'adjonction d'hormone ou d'AMP cyclique ne modifie pas non plus la production

de corps cétoniques, ni le quotient $-C3/_{+C6}$ qui représente la captation de substrat par rapport à la production de glucose. Lorsque toutes les molécules de substrat captées sont transformées en glucose, ce quotient doit être de 2. Dans toutes les situations étudiées, on peut constater que ce quotient se situe aux environs de 3. Pour chaque molécule de glucose formée, une molécule de substrat est donc utilisée à d'autres fins que la gluconéogénèse (par exemple oxydation, transamination). Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié la gluconéogénèse en utilisant, comme précurseur, du lactate uniformément marqué au ^{14}C . Ces perfusions ont été effectuées en circuit ouvert, le lactate étant infusé dans la veine porte 20 minutes après le début de la perfusion. Vingt minutes plus tard, le glucagon est infusé à son tour. On mesure parallèlement la production de glucose et celle de glucose marqué. La figure montre les deux types de résultats obtenus par cette série de perfusions. Dans certains cas (Figure 6A), nous voyons que la production de glucose et celle de glucose marqué augmente régulièrement après l'infusion de U- ^{14}C lactate pour atteindre un plateau après 10 minutes et que, dès que le glucagon est ajouté, nous obtenons une augmentation légère et transitoire de la production de glucose froid, sans augmentation parallèle du glucose marqué. Ceci démontre que cette augmentation de la production de glucose provient de la glycogénolyse. Dans d'autres cas (Figure 6B), nous constatons que l'infusion de glucagon ne provoque aucun changement ni de la production de glucose non radioactif, ni de celle du glucose marqué, confirmant ainsi la réalité de l'observation de l'absence d'effet du glucagon sur la gluconéogénèse observé précédemment en utilisant la technique de perfusion du foie en circuit fermé (Tableau 4).

Figure 6

Gluconéogénèse par le foie perfusé de souris à jeun: absence d'effet du glucagon.



Foies perfusés en circuit ouvert. Au temps indiqué, le lactate- $\text{U-}^{14}\text{C}$ (5 mM, 20 $\mu\text{Ci/mMole}$) est infusé, puis le glucagon 10^{-9} M, 20 minutes plus tard. Souris à jeun depuis 12 heures.

Tableau 4

Effet du glucagon, de l'adrénaline et de l'AMP cyclique sur la gluconéogénèse et la cétogénèse dans le foie perfusé de souris à jeun.

Addition M	N	Substrat mM	Production de glucose $\mu\text{mole}/100\text{g}/\text{h}$	Production de cétones $\mu\text{mole}/100\text{g}/\text{h}$	$\frac{-C_3}{-C_6}$
0	7	0	74 ± 7	194 ± 23	---
0	7	Pyruvate 10	335 ± 17	44 ± 12	$3,2 \pm 0,2$
Glucagon 1×10^{-9}	7	Pyruvate 10	380 ± 27	46 ± 11	$3,3 \pm 0,2$
0	11	Pyruvate 10	355 ± 31	91 ± 9	$3,5 \pm 0,2$
Adrénaline 1×10^{-7}	11	Pyruvate 10	420 ± 33	116 ± 19	$3,3 \pm 0,2$
0	6	Pyruvate 10	339 ± 30	101 ± 14	$3,4 \pm 0,2$
AMP cyclique 1×10^{-4}	5	Pyruvate 10	464 ± 65	82 ± 15	$3,3 \pm 0,2$
0	7	Lactate 10	314 ± 21	101 ± 27	$2,6 \pm 0,2$
Glucagon 1×10^{-9}	8	Lactate 10	375 ± 26	121 ± 27	$2,8 \pm 0,2$

Foies de souris à jeun perfusés en recirculation pendant 90 min. Les substrats et l'AMP cyclique ont été ajoutés dans le réservoir après 30 minutes. Les hormones sont infusées dans la veine porte. $\frac{-C_3}{-C_6}$ est le quotient du substrat capté par rapport au glucose formé.

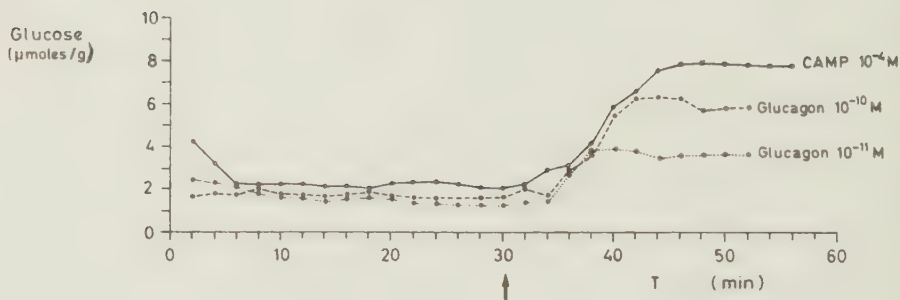
5. Effet du glucagon, de l'adrénaline et de l'AMP cyclique sur la glucoqénolyse dans le foie perfusé de souris nourries

La stimulation de la glycogénolyse par le glucagon, l'adrénaline et l'AMP cyclique a été étudiée dans le foie perfusé de souris nourries. Nous avons également essayé de déterminer la concentration minimale de glucagon nécessaire à augmenter la production de glucose. Dans le tableau 5, nous voyons que le glucagon (10^{-11} M) augmente la production de glucose par le foie perfusé en recirculation. La même expérience a été faite en circuit ouvert pour exclure l'effet d'une accumulation du glucagon dont on ne connaît pas le pourcentage de dégradation en un passage à travers le foie. La figure 7 montre que 1 à 2 minutes après que le glucagon ait été infusé dans la veine porte, on peut mesurer une augmentation de la production de glucose (en raison de l'espace mort, il faut tenir compte d'un retard de 3 à 4 minutes entre le début de l'infusion de glucagon et son apparition effective dans le foie).

La glycogénolyse est proportionnelle à la concentration de glucagon entre 10^{-11} et 10^{-8} M (Tableau 5, Figure 7), des concentrations plus élevées n'ayant pas été utilisées. Notons que des concentrations élevées d'adrénaline sont nécessaires pour stimuler la glycogénolyse (au moins 10^{-8} M). L'AMP cyclique utilisé à 10^{-4} ou à 10^{-5} M produit également une stimulation de la glycogénolyse.

Figure 7

Glycogénolyse par le foie perfusé de souris nourries: effet du glucagon et de l'AMP cyclique.



Foies perfusés en circuit ouvert. Le glucagon et l'AMP cyclique sont ajoutés au temps désigné par la flèche. Il y a un délai de 3-4 minutes entre l'infusion de l'hormone et la collecte du perfusat à la sortie du foie.

Tableau 5

Effet du glucagon, de l'adrénaline et de l'AMP cyclique sur la glycogénolyse dans le foie perfusé de souris nourries.

Addition et concentrations M	Production de glucose (μ mole/100 g/heure)
0	208 $\pm$ 51
<u>Glucagon</u>	
1×10^{-11}	321 $\pm$ 56
1×10^{-10}	449 $\pm$ 80
1×10^{-9}	614 $\pm$ 100
1×10^{-8}	1265 $\pm$ 97
<u>Adrénaline</u>	
1×10^{-8}	503 $\pm$ 32
1×10^{-7}	952 $\pm$ 41
<u>AMP cyclique</u>	
1×10^{-5}	555 $\pm$ 50
1×10^{-4}	976 $\pm$ 64

Foies de souris nourries perfusés en recirculation pendant 75 min. Les hormones sont infusées à 15 min. dans le perfusé, près du foie. L'AMP cyclique est ajouté dans le réservoir, en une fois. Les valeurs sont des moyennes de 4 expériences $\pm$ S.E.

PARTIE II

1. Gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins

Le tableau 1 montre que la souris ob/ob a une glycémie légèrement plus élevée que la souris normale. Il était concevable que cette élévation de la glycémie soit due à une augmentation de la gluconéogenèse. Pour tester ce point, le foie provenant de souris obèses ou de souris témoins, nourries et à jeun, a été perfusé avec du lactate (10 mM) ou du pyruvate (2 mM).

Dans l'expérience utilisant des souris à jeun (24 h de jeûne), du lactate (10 mM) a été ajouté au perfusat et l'accumulation de glucose dans celui-ci a été mesurée. En effet, après 24 h de jeûne, le foie de la souris témoin contient moins de 1 mg glucose/g foie et celui de la souris ob/ob moins de 5 mg glucose/g foie. Le glucose accumulé dans le perfusat provient donc essentiellement de la gluconéogenèse, des perfusions effectuées en l'absence de substrat montrent qu'il n'y a qu'une très faible production basale de glucose provenant en partie du glycogène, en partie de la faible quantité de lactate présente dans le perfusat. Le tableau 6 permet de voir que la différence de production de glucose, en l'absence et en présence de lactate 10 mM, est la même dans les deux groupes. Des résultats identiques ont été obtenus en utilisant, comme substrat, l'alanine 10 mM. La gluconéogenèse chez les souris nourries a été déterminée par l'incorporation de pyruvate- $U-^{14}C$ (2 mM) dans le glucose du perfusat. La perfusion a été effectuée en circuit ouvert et le pyruvate infusé à une vitesse permettant de maintenir une concentration constante dans le perfusat entrant dans le foie. Le glucose- ^{14}C formé n'est pas significativement différent dans les deux groupes: 16 ± 1 μ mole glucose/g/h pour les souris témoins, 19 ± 2 μ mole/g/h pour les souris obèses (Tableau 7).

Ainsi, dans aucune des deux situations étudiées (animaux nourris ou à jeun), on n'observe de différence dans la gluconéo-

Tableau 6

Gluconéogénèse dans le foie perfusé de souris obèses et témoins à jeun.

Production de glucose $\mu\text{mole/g/h}$			
Animaux	sans substrat dans le perfusat (A)	Lactate 10 mM dans le perfusat (B)	B - A
Témoins	14 $\pm$ 7	62 $\pm$ 8	48 *
<u>Ob/ob</u>	8 $\pm$ 6	55 $\pm$ 5	47 *

Les foies de souris à jeun depuis 24 heures ont été perfusés en recirculation. Le lactate a été ajouté dans le tambour au début de l'expérience. Chaque valeur est la moyenne de 5 expériences $\pm$ S.E.

* Différence entre souris obèses et témoins non significative.

Tableau 7

Métabolisme du pyruvate dans le foie perfusé de souris obèses et témoins nourries.

	Témoins μmole/g/h	<u>Ob/ob</u>
<u>Perfusat:</u>		
Pyruvate capté	120 ± 2	112 ± 4
Production de lactate	49 ± 3	31 ± 5
Production de glucose marqué	16 ± 1	19 ± 2
Oxydation de U- ¹⁴ C-pyruvate en ¹⁴ CO ₂	12 ± 1,3	6 ± 1,2*
<u>Foie:</u>		
Incorporation de U- ¹⁴ C-pyruvate en acides gras	0,96 ± 0,23	2,47 ± 0,38*

Les foies de souris ob/ob et témoins ont été perfusés en utilisant un circuit ouvert, avec un milieu contenant du pyruvate-U-¹⁴C 2 mM (25 μCi/mmole).

Chaque valeur est la moyenne de 3 expériences ± S.E.

* p < 0.05

génèse du foie de la souris témoin par rapport à celui de la souris obèse-hyperglycémique. Des résultats semblables ont déjà été décrits précédemment par un autre groupe (15).

2. Lipogénèse à partir de pyruvate dans le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins

Dans une première série d'expériences, l'incorporation de pyruvate (uniformément marqué) en lipides a été mesurée. Ce précurseur a été choisi pour les raisons suivantes: dans les cellules adipeuses isolées et les mitochondries isolées du tissu adipeux, des expériences ont montré que l'activité de la pyruvate déshydrogénase peut être augmentée par l'insuline (12,42,57). Bien qu'aucune preuve n'existe que la pyruvate déshydrogénase du foie réponde de la même manière, il était important de vérifier si le foie des souris obèses-hyperglycémiques, constamment exposé à des concentrations élevées d'insuline endogène, avait une lipogénèse plus importante à partir de pyruvate. Une concentration faible mais non physiologique (2 mM) de ce précurseur a été utilisée puisqu'à hautes concentrations le pyruvate lui-même stimule la pyruvate déshydrogénase (56,75).

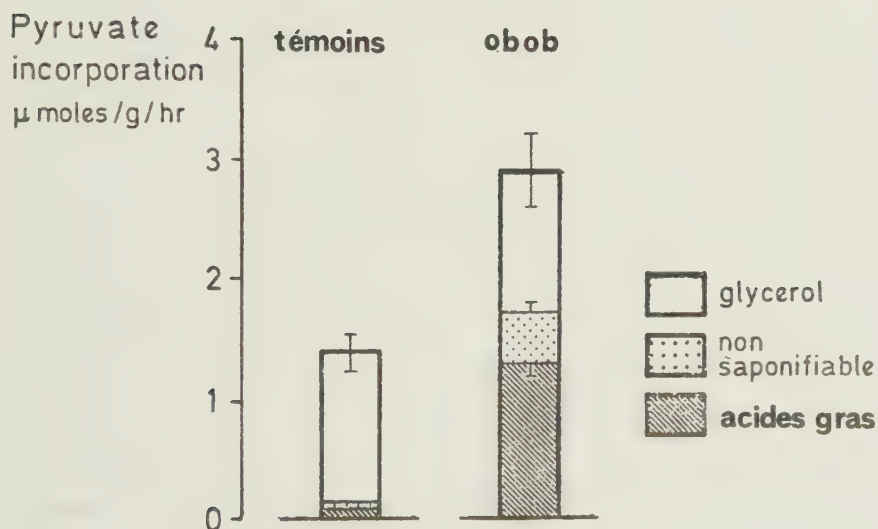
Pour éviter au maximum une ré-utilisation du glucose marqué, formé à partir de pyruvate et obtenir une concentration précise et constante du précurseur, la perfusion en circuit ouvert a été choisie pour ce type d'expérience. Le tableau 7 montre les résultats obtenus. La captation de pyruvate ainsi que la production de lactate et de glucose marqué ne sont pas significativement différentes dans les deux groupes étudiés. L'oxydation de pyruvate uniformément marqué en $^{14}\text{CO}_2$ est plus faible dans le foie perfusé des souris obèses-hyperglycémiques par rapport aux souris témoins. Par contre,

l'incorporation de pyruvate en acides gras (obtenus après saponification des triglycérides hépatiques) est nettement plus élevée chez les souris obèses-hyperglycémiques. La figure 8 présente, dans une autre série d'expériences, l'incorporation relative du pyruvate dans les lipides totaux (avant saponification), dans les acides gras des triglycérides, dans l'insaponifiable et dans la partie glycérol des triglycérides (cette dernière est obtenue en soustrayant de la radioactivité des lipides totaux, celle des acides gras et de l'insaponifiable). La figure montre clairement que dans le foie perfusé de souris témoins, la majeure partie de la radioactivité est retrouvée dans le glycérol et très peu dans les acides gras, tandis que dans le foie des souris obèses-hyperglycémiques 50% environ de la radioactivité se retrouve dans les acides gras des triglycérides. Le foie perfusé de la souris obèse-hyperglycémique incorpore donc le pyruvate préférentiellement dans les acides gras, ceci contrairement à la souris témoin qui, elle, l'incorpore davantage dans la fraction glycérol des triglycérides.

Les expériences qui utilisent un précurseur hydrocarboné pour l'étude de la comparaison de la lipogénèse entre souris obèses-hyperglycémiques et témoins offrent quelques inconvénients. D'une part, le foie des souris obèses-hyperglycémiques contient davantage de glycogène que celui des témoins (1). D'autre part, les activités de plusieurs enzymes glycogénolytiques (glucokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase) et gluconéogéniques (fructose-1-6-diphosphatase, glucose-6-phosphatase) semblent différer dans le foie des deux types de souris (61). Cela a pour conséquence que l'activité spécifique du pyruvate peut être différent dans les deux groupes, rendant ainsi les résultats difficiles à interpréter.

Figure 8

Lipogénèse à partir de pyruvate- $U-^{14}C$ dans le foie perfusé de souris obèses et témoins nourries.



Les foies de souris ob/ob et témoins ont été perfusés en utilisant un circuit ouvert, avec un milieu contenant du pyruvate- $U-^{14}C$ 2 mM (25 μ Ci/mmmole). Chaque valeur est la moyenne de 5 expériences $\pm$ S.E.

glycérol = glycérol après saponification des triglycérides

acides gras = acides gras après saponification des triglycérides

A: souris témoins

B: souris ob/ob

3. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé des souris obèses-hyperglycémiques et des souris témoins

Pour les raisons discutées ci-dessus, il fallait trouver une mesure directe de la lipogénèse, indépendante de l'activité spécifique du précurseur utilisé. L'utilisation de l'eau tritiée ($^3\text{H}_2\text{O}$) semble permettre de résoudre ce problème. Elle offre, en outre, l'avantage d'avoir une activité spécifique constante au cours de la perfusion et de permettre ainsi d'utiliser la technique de la recirculation.

La figure 9 montre le schéma expérimental. Le foie est perfusé avec un milieu contenant de l'eau tritiée, avec ou sans substrat. On mesure l'incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides du foie, ainsi que dans les triglycérides nouvellement synthétisés et sécrétés par le foie (acides gras des triglycérides du perfusat). Il fallait d'abord démontrer la linéarité de la lipogénèse, en fonction du temps, dans le foie perfusé. En présence de glucose (11.2 mM), la lipogénèse a été mesurée dans le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et témoins pendant des temps de perfusion variant de 15 à 120 minutes. La figure 10 montre, dans les deux cas, une incorporation linéaire du tritium dans les lipides hépatiques en fonction du temps. On voit également que le foie de souris obèse-hyperglycémique incorpore deux fois plus de tritium dans les lipides hépatiques que le foie de souris témoin. Il était important de démontrer que la lipogénèse in vitro pouvait être comparée à la lipogénèse in vivo et avait ainsi une signification pathophysiologique. C'est pourquoi des souris obèses-hyperglycémiques et témoins anesthésiées ont reçu 2 mC d'eau tritiée ($^3\text{H}_2\text{O}$) dans une veine de la queue.

Figure 9

Schéma expérimental

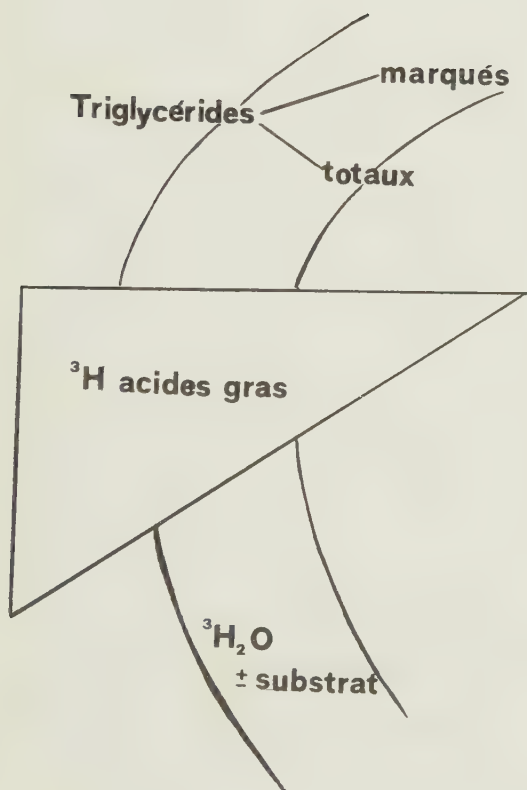
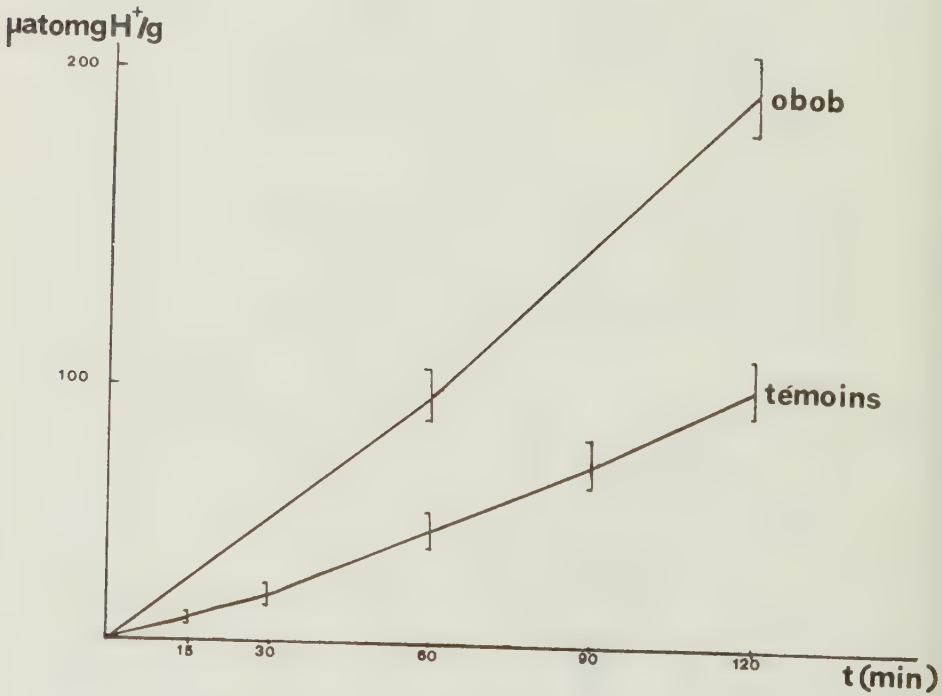


Figure 10

Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses et témoins nourries: variation en fonction du temps.



Les foies de souris obèses et témoins ont été perfusés pendant 15 - 120 min. en recirculation avec un milieu contenant du glucose 11.1 mM.

Soixante minutes après l'injection, du sang a été prélevé dans le sinus rétro-orbitaire pour la mesure de l'activité spécifique de l'eau tritiée. Après 120 minutes, les animaux ont été sacrifiés, le foie prélevé pour la mesure des lipides marqués, du sang conservé pour vérifier l'invariabilité de l'activité spécifique. L'incorporation de tritium dans les acides gras correspond à $266 \mu\text{atom g/g/2 h}$ ($n=2$) pour la souris obèse-hyperglycémique et $97 \pm 5 \mu\text{atom g/g/2 h}$ ($n=3$) pour la souris témoin. Si nous comparons ces résultats à ceux de la figure 10 (perfusions effectuées à la même époque que l'expérience in vivo), nous voyons d'une part que l'ordre de grandeur des lipogénèses ainsi obtenu est le même, d'autre part que la différence observée entre souris obèses-hyperglycémiques et témoins est maintenue. On peut objecter, dans les expériences in vivo que la glycémie n'est pas la même dans les deux groupes, par contre la perfusion permet une comparaison à concentration égale de substrat dans les deux groupes.

4. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins en présence de différents substrats. Relation avec la libération de triglycérides nouvellement synthétisés

L'incorporation de tritium dans les lipides du foie et du perfusat a été mesurée en l'absence et en présence de substrats (Tableau 8). En l'absence de substrat dans le perfusat, le foie de souris obèse-hyperglycémique incorpore plus de tritium dans les acides gras des triglycérides hépatiques ainsi que dans les lipides nouvellement synthétisés et sécrétés que le foie des témoins. L'adjonction de substrats (glucose, fructose, pyruvate, acétate) augmente l'incorporation de tritium dans les lipides du

Tableau 8

Incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides par le foie perfusé de souris obèses et témoins: effet de différents substrats.

		T é m o i n s		O b è s e s			
		3H incorporé en		3H incorporé en			
		AGTG totaux*	AGTG libérés**	AGTG totaux*	AGTG libérés**	% AGTG libérés***	% AGTG libérés***
		µatom/g/h		µatom/g/h			
0	8	38 ± 5	8 ± 3	93 ± 17	20 ± 4		22
Glucose 11.1 mM	4	103 ± 13	21 ± 5	318 ± 27	74 ± 13		23
Fructose 2 mM	3	92 ± 20	13 ± 5	218 ± 13	39 ± 17		18
Pyruvate 1 mM	4	78 ± 14	11 ± 3	106 ± 13	18 ± 4		17
Acétate 10 mM	4	347 ± 53	68 ± 12	614 ± 75	94 ± 21		15

* AGTG totaux = incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides du foie et du perfusat

** AGTG libérés = incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides libérés dans le perfusat

*** % AGTG libérés = pourcentage des AGTG totaux qui est libéré dans le perfusat

foie et du perfusat dans les deux groupes. Cependant, dans tous les cas, le foie perfusé de souris obèse-hyperglycémique incorpore plus de tritium dans les lipides que le foie de souris témoin.

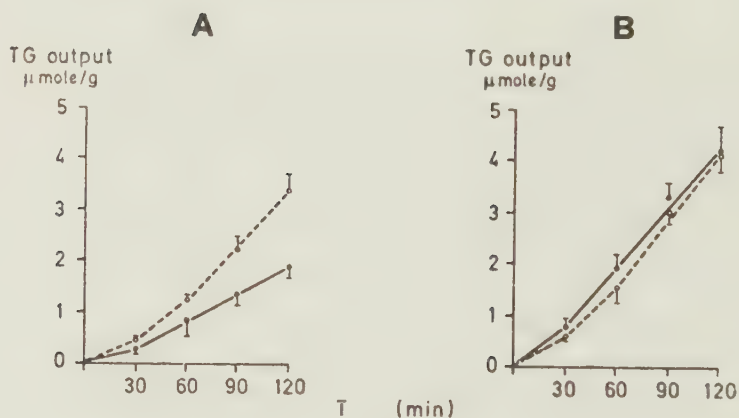
Les triglycérides nouvellement synthétisés et sécrétés dans le perfusat augmentent également après l'adjonction de substrats. Le rapport des lipides marqués sécrétés aux lipides totaux marqués varie peu dans les deux groupes de souris, oscillant entre 14-23%.

5. Sécrétion de triglycérides par le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins: cétoqénèse

Après avoir mis en évidence l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion de lipides marqués, par le foie perfusé de la souris obèse-hyperglycémique, nous avons mesuré la production totale de triglycérides (marqués + non marqués). La figure 11 montre cette production en fonction du temps. En l'absence d'acides gras exogènes, le foie perfusé de souris obèse-hyperglycémique produit deux fois plus de triglycérides que le foie de souris témoin. Lorsque de l'oléate lié à l'albumine est ajouté dans le perfusat, le foie de la souris témoin augmente sa production de triglycérides, comme cela a été décrit pour le foie perfusé du rat (43). Par contre, le foie perfusé de souris obèse ne modifie pas sa production de triglycérides, bien qu'il capte les acides gras du perfusat de la même manière que le foie de la souris témoin. L'oxydation des acides gras en corps cétoniques (acétoacétate + β -hydroxybutyrate) est également très différente dans les deux groupes, le foie perfusé de la souris témoin oxydant beaucoup plus d'acides gras en corps cétoniques que celui de la souris obèse-hyperglycémique (Figure 12).

Figure 11

Sécrétion de triglycérides par le foie perfusé de souris obèses et témoins nourries: effet des acides gras.



Foies perfusés en recirculation avec un milieu contenant du glucose 11.1 mM et de l'oléate 2 mM (si mentionné).

Chaque point est la moyenne de 3 expériences $\pm$ S.E.

A: souris témoins; B: souris ob/ob

— sans oléate

---- oléate 2 mM

6. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques traitées à la streptozotocine

Bien qu'une action directe de l'insuline sur la lipogénèse hépatique ne soit pas clairement démontrée, il n'en demeure pas moins que de nombreuses expériences montrent que l'insuline exerce, d'une façon ou d'une autre, un effet stimulateur sur la lipogénèse hépatique ainsi que sur l'activité de plusieurs enzymes de la lipogénèse (50,54). L'insuline immunoréactive circulante très élevée des souris obèses-hyperglycémiques pourrait ainsi être l'une des causes de l'augmentation de la lipogénèse hépatique chez ces animaux (70).

Un groupe de souris obèses-hyperglycémiques a donc été traité à la streptozotocine, un agent β -cytotoxique (220-230 mg/kg). Six à dix jours plus tard, le foie de ces animaux a été perfusé, la lipogénèse a été mesurée et comparée à celle d'un groupe de souris obèses-hyperglycémiques du même âge, mais n'ayant pas reçu de streptozotocine.

Le tableau 9 montre que, dans deux séries d'expériences (A et B), le traitement à la streptozotocine produit une diminution marquée de l'insuline plasmatique immunoréactive, un ralentissement du gain de poids (voire même une perte de poids dans l'expérience B), une diminution des lipides hépatiques et une augmentation de la glycémie. L'incorporation totale (foie + perfusat) de tritium dans les acides gras des triglycérides en présence de glucose (11.2 mM) est diminuée dans le groupe d'animaux dont l'insuline circulante a été préalablement réduite par le traitement à la streptozotocine. De même, l'incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides nouvellement synthétisés et sécrétés

Tableau 9

Incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides (AGTG) par le foie perfusé de souris obèses non traitées et traitées à la streptozotocine

Streptozotocine injectée (mg/kg)	N	Δ poids corporel (g)	Glycémie (mg %)	Insuline plasmatique (ng/ml)	Lipides hépatiques (mg/g)	³ H incorporé en	
						AGTG totaux*	AGTG libérés**
						µatom/g/h	
<u>Exp. A</u>							
0	4	+ 6,4	297 ± 23	4,7 ± 1,2	146 ± 21	179 ± 22	36 ± 7
220	4	+ 0,7	402 ± 44	1,8 ± 0,3	75 ± 14	93 ± 18	22 ± 4
<u>Exp. B</u>							
0	6	+ 3,0	280 ± 28	6,8 ± 2,2	179 ± 17	124 ± 19	26 ± 5
230	5	- 2,7	382 ± 40	1,9 ± 0,3	67 ± 16	19 ± 6	7 ± 2

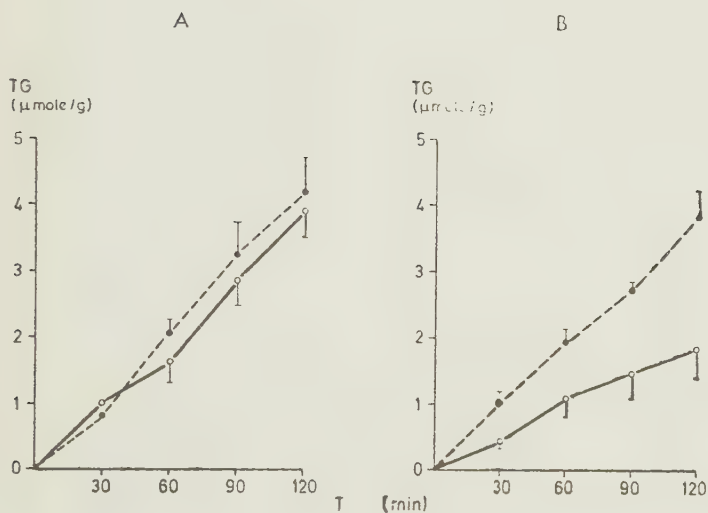
Les foies de souris ob/ob traités à la streptozotocine ont été perfusés 10 jours (exp. A) ou 6 jours (exp. B) après le traitement avec du glucose 11.1 mM dans le perfusat.
 Δ poids corporel: variation du poids de l'animal entre le traitement à la streptozotocine et le jour de la perfusion.

* AGTG totaux = incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides du foie et du perfusat

** AGTG libérés = incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides libérés dans le perfusat

Figure 13

Sécrétion de triglycérides par le foie perfusé de souris obèses
non traitées et traitées à la streptozotocine: effet des acides gras.



Foies perfusés en recirculation avec un milieu contenant du glucose 11,1 mM et de l'oléate 1,5 mM (si mentionné).

Chaque point est la moyenne de 3-4 expériences $\pm$ S.E.

A: souris obèses non traitées; B: souris obèses traitées à la streptozotocine

— sans oléate

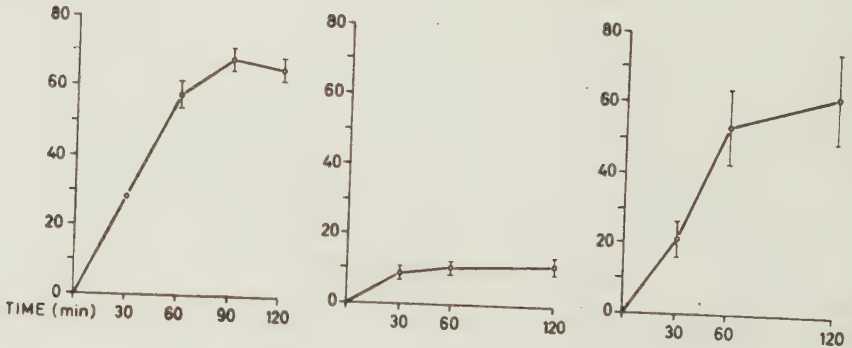
oléate 1,5 mm

Figure 12

Production de corps cétoniques (acétoacétate + β -hydroxybutyrate) par le foie perfusé de souris nourries témoins, obèses, et obèses traitées à la streptozotocine.

corps cétoniques

(μ moles / g)



Foies perfusés en recirculation avec un milieu contenant du glucose 11.1 mM et de l'oléate 1.2 mM.

Chaque point est la moyenne de 3 expériences $\pm$ S.E.

A: souris témoins; B: souris ob/ob; C: souris ob/ob traitées à la streptozotocine

dans le perfusat est diminuée quand l'insulinémie est diminuée. La production totale de triglycérides (marqués + non marqués), par le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques traitées à la streptozotocine, se rapproche de celle des souris témoins, comme le montre la figure 13. Ainsi, la sécrétion de triglycérides peut être stimulée par l'adjonction d'oléate dans le perfusat dans le groupe de souris hyperglycémiques, dont le taux d'insuline circulant a été diminué par la streptozotocine. De plus, l'oxydation des acides gras en corps cétoniques est augmentée dans le groupe d'animaux traités, comparée à celle mesurée dans le groupe non traité. La figure 12 permet de voir que cette oxydation atteint les mêmes valeurs que celles observées dans le foie perfusé d'animaux témoins.

La diminution chronique du taux de l'insuline circulante des souris obèses-hyperglycémiques permet donc d'atténuer ou même de supprimer les anomalies du métabolisme des lipides du foie des souris obèses-hyperglycémiques.

7. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins traitées au sérum anti-insuline (SAI)

On a vu qu'une diminution chronique de l'insuline circulante chez les souris obèses produit une diminution de l'incorporation de tritium dans les lipides. Les effets d'une diminution aiguë de l'insuline ont été étudiés en traitant des souris obèses-hyperglycémiques et témoins avec du sérum anti-insuline (SAI) (provenant de cobaye), injecté i.v. 2 heures avant la perfusion. Le groupe témoin a reçu du sérum de cobaye.

La lipogénèse a été mesurée en présence de glucose 16.5 mM dans le perfusat.

Tableau 10

Incorporation de tritium dans les acides gras du foie perfusé des souris obèses-hyperglycémiques et témoins: action du sérum anti-insuline.

	glycémie mg %	Incorporation de ^3H dans les AGTG** hépatiques μatom g/g/h
<u>Ob/ob</u>	174 ± 10	165 ± 30
<u>Ob/ob</u> traitées au SAI*	720 ± 82	83 ± 8
Témoins	155 ± 11	78 ± 6
Témoins traités au SAI*	343 ± 59	45 ± 3

* SAI: sérum anti-insuline

** AGTG: acides gras des triglycérides

Les foies des souris ob/ob et témoins ont été perfusés 2 heures après avoir reçu 0.1 ml de sérum anti-insuline dans la veine de la queue. Le perfusat contenait 16.7 mM glucose et 4 mC de $^3\text{H}_2\text{O}$.
Moyenne de 4 expériences ± S.E.

Le tableau 10 montre que dans les deux groupes d'animaux étudiés (témoins et obèses), le traitement au sérum anti-insuline produit une diminution de 30-50% de l'incorporation de tritium dans les lipides du foie et du perfusat, en présence de glucose 16.5 mM dans le perfusat.

8. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et de souris témoins: effet des acides gras dans le perfusat.

Les acides gras ont une action inhibitrice sur la lipogénèse (31,32,33), probablement par l'intermédiaire de leur acyl-CoA. C'est pourquoi l'incorporation de tritium dans les lipides du foie et du perfusat a été mesurée en présence d'acides gras, avec du glucose 16.7 mM comme substrat. Le tableau 11 permet de voir que les acides gras exogènes inhibent l'incorporation de tritium dans les acides gras du foie chez les souris témoins en l'absence de substrat ou en présence de glucose 16.7 mM. Dans le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques, on ne voit pas (ou à un moindre degré) cette action inhibitrice des acides gras exogènes sur la lipogénèse en présence de glucose.

Tableau 11

Incorporation de tritium dans les acides gras du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et témoins: effet des acides gras.

	Incorporation de tritium dans les AGTG* hépatiques $\mu\text{atom}^3\text{H}^+/\text{g foie/h}$	
	sans oléate	avec oléate
Témoins	94 ± 14	$45 \pm 11^{\text{a})}$
<u>Ob/ob</u>	197 ± 26	$138 \pm 7^{\text{b})}$

a) p 0.05

b) N.S.

Les foies des souris ob/ob et témoins ont été perfusés avec un milieu contenant 1.2 mM oléate.

Moyenne de 3 expériences $\pm$ S.E.

IV. DISCUSSION

PARTIE I

1. Perfusion

La perfusion de foie in situ, telle qu'elle a été décrite et utilisée pour le foie de rat par le groupe d'Exton et Park (16) a permis d'étudier certains aspects du métabolisme des hydrates de carbone et des lipides dans le foie de souris albinos ou dans le foie de souris obèses et de témoins non obèses. Quelques paramètres ont été préalablement mesurés afin de s'assurer du bon état de préservation et de fonctionnement du foie pendant et à la fin de la perfusion. Le potassium ne varie pas dans le perfusat entre le début et la fin de la perfusion. La pO_2 a été mesurée à l'entrée et à la sortie du foie, dans une situation où la consommation d'oxygène est importante, (en présence de lactate 10 mM). Avant le passage dans le foie, la pO_2 est de 226 mmHg dans le perfusat, à la sortie elle vaut 58 mmHg. Le contenu du foie en ATP a été déterminé après 90 minutes de perfusion; il était de 2.0 ± 0.3 $\mu\text{mole/g}$ ($n=10$), comparé à 1.8 ± 0.2 $\mu\text{mole/g}$ ($n=5$) chez des animaux décapités dont le foie est immédiatement congelé dans l'azote liquide.

Quelques foies ont été fixés au glutaraldéhyde 2% après 2 heures de perfusion et examinés au microscope électronique. Ils ne présentent ni gonflement des mitochondries ni altérations du réticulum endoplasmique. Ces critères, ainsi que la linéarité de la gluconéogenèse, de la synthèse de lipides, de la sécrétion de triglycérides et la sensibilité aux hormones dénotent une préservation satisfaisante du parenchyme hépatique et du

fonctionnement métabolique du foie.

2. Gluconéogenèse

La figure 3 montre qu'en présence de concentrations supra maximales de substrat, la production de glucose est linéaire pendant 90 minutes. Il existe une différence entre la capacité gluconéogénique de substrats tels que le fructose et le dihydroxyacétone et d'autres substrats tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol et l'alanine. Cette différence a déjà été observée dans le foie perfusé de rat (16,19,76,79), elle suggère l'existence d'une étape limitante située entre le pyruvate et la formation des trioses phosphates. Cette étape limitante semble donc exister également chez la souris puisque les substrats entrant dans la voie gluconéogénique avant les trioses phosphates saturant plus rapidement que ceux entrant au niveau des trioses phosphates (Figure 3).

Le lactate et le pyruvate, en concentrations égales, produisent la même quantité de glucose. L'apport de lactate représente une production de NADH ce qui n'est pas le cas pour le pyruvate; le quotient NAD/NADH cytoplasmique ne semble donc pas influencer la gluconéogenèse de façon significative.

3. Cétoqenèse

La production basale de corps cétoniques par le foie perfusé de souris à jeun depuis 12 heures est très importante, comparée à celle du rat mesurée dans les mêmes conditions après un jeûne de 24 heures (16,79). Ceci semble indiquer que l'apport endogène d'acides gras est plus important chez la souris que chez le rat. Tous les substrats gluconéogéniques utilisés dans ce travail ont

une action inhibitrice sur la cétogenèse suggérant qu'en absence de substrats, la production d'ATP dépend en partie de l'oxydation des acides gras. En présence d'un précurseur, soit l'oxydation des acides gras est totale soit l'oxydation du précurseur remplace celle des acides gras comme source d'énergie. Le quotient $\frac{-C_3}{+C_6} \left(\frac{\mu\text{moles de substrats utilisé}}{\mu\text{moles de glucose formé}} \right)$ trouvé aux environs de trois parle en faveur de cette dernière possibilité. Il indique que pour 2 molécules de précurseur formant une molécule de glucose, nous avons 1 molécule de précurseur utilisée à d'autres fins (transaminations, oxydations, etc.).

4. Substrats à doses physiologiques

Le lactate, le pyruvate, le glycérol et certains acides aminés sont les principaux substrats glucoformateurs in vivo notamment dans le jeûne et le diabète. Dans la figure 4 nous voyons que lorsqu'un mélange de ces substrats à des concentrations "physiologiques" (concentrations trouvées dans le sérum d'un animal à jeun) est infusée dans le foie, la production de glucose est augmentée de 2 fois, suggérant que in vivo l'apport de substrats provenant de la périphérie constitue une régulation importante de la gluconéogenèse.

5. Absence d'effet des acides gras sur la gluconéogenèse

Un effet stimulateur de l'oxydation des acides gras exogènes sur la gluconéogenèse a été décrit dans le foie perfusé de rat par différents groupes (64,69,76). En présence de précurseurs tels que l'alanine, le pyruvate et le lactate, l'addition d'acides gras liés à l'albumine produit une augmentation de la production

de glucose.

Ces expériences, répétées chez la souris afin de déterminer si les acides gras sont également importants, ont donné des résultats différents du rat (Tableau 3). On ne constate aucune stimulation en présence d'oléate 1 mM, bien que l'oléate ait été capté et oxydé.

Nous avons déjà mentionné que la production de corps cétoniques était très élevée chez la souris, indiquant un apport important d'acides gras endogènes. Nous avons donc essayé de diminuer l'apport endogène d'acides gras afin de voir si de cette manière, nous obtenions une diminution de la production de glucose à partir de lactate ou de pyruvate. La lipase hépatique peut être inhibée par la glycodiazine (34) présente dans le perfusat à une concentration de 7.5 mM. La production de corps cétoniques est fortement diminuée en présence de cet agent (Tableau 3). La forte diminution (80%) de l'oxydation des acides gras endogènes est accompagnée d'une diminution relativement faible (30%) de la gluconéogenèse à partir de pyruvate. L'addition d'acides gras dans le perfusat, qui peuvent être oxydés quand la lipase est inhibée, ne produit pas une restauration totale de la gluconéogenèse, quoique celle-ci soit significativement plus élevée que lorsque la glycodiazine est ajoutée sans les acides gras.

Après 12 heures de jeûne chez la souris, le foie contient 20-30 $\mu\text{mole/g}$ de triglycérides, alors que le rat après 24 heures de jeûne (temps de jeûne étudié par la plupart des auteurs) les triglycérides ne sont que de 5-10 $\mu\text{mole/g}$ (rats Wistar). On peut donc penser que la différence entre rats et souris réside principalement dans un apport endogène d'acides gras très différent dans les deux groupes qui a pour conséquence, chez la souris, une

stimulation maximale de la gluconéogenèse.

6. Absence d'effet du glucagon et de l'AMP cyclique sur la gluconéogenèse.

Tous les groupes ayant étudié l'action du glucagon sur la gluconéogenèse dans le foie perfusé de rat décrivent une action stimulante de cette hormone sur l'incorporation de différents substrats (lactate, pyruvate, alanine) en glucose (18,19,26,59,71,77). La façon dont le glucagon stimule la gluconéogenèse n'est toute fois pas totalement élucidée. Wieland et collaborateurs proposent une double action du glucagon, la première en stimulant la lipase hépatique, augmentant ainsi la quantité d'acyl CoA libre, la seconde en stimulant une étape enzymatique limitante entre le pyruvate et le phosphoénolpyruvate. Les travaux de ce groupe montrent en effet qu'en inhibant la lipase hépatique par la glycodiazine, l'action stimulante du glucagon est réduite.

D'autres groupes pensent que l'action du glucagon s'exerce principalement au niveau de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (18,59,71). Ces auteurs ont mesuré la concentration hépatique des intermédiaires entre le pyruvate et le glucose en présence d'une part du précurseur, d'autre part du précurseur et du glucagon. Les résultats de ces expériences ont montré qu'une étape limitante est accélérée entre le pyruvate et le phosphoénolpyruvate.

L'action du glucagon est également accompagnée d'une augmentation de l'AMP cyclique dans le tissu et dans le perfusat.

Les résultats obtenus dans le foie perfusé de souris sont difficilement explicables par rapport à ce qui est décrit chez

le rat. L'apport d'acides gras endogènes étant suffisant, il paraît normal que la composante de l'action du glucagon agissant via une stimulation de la lipolyse n'ait pas lieu. Par contre, comme nous l'avons déjà décrit, l'étape limitante entre le pyruvate et les trioses phosphates semble également exister chez la souris. La raison pour laquelle cette étape n'est pas stimulée par la glucagon ne peut être expliquée que par une localisation différente de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (46) (ce qui paraît peu vraisemblable) ou par le fait que la gluconéogenèse est déjà stimulée au maximum chez l'animal à jeun.

Chez le cobaye, où le glucagon n'a pas d'action stimulatrice sur la gluconéogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase est principalement située dans les mitochondries (65) où elle n'est pas aussi accessible à l'action du glucagon; par contre, bien qu'il existe peu d'informations à ce sujet, il semble que la PEP carboxykinase du foie de souris soit principalement cytoplasmique et qu'il n'y en ait que des traces dans les mitochondries (46).

2. Régulation de la gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que ni les acides gras, ni le glucagon ne modifient la gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris à jeun. Par contre, il semble que le facteur le plus important soit la quantité de substrat disponible arrivant au foie. Les concentrations physiologiques des substrats gluconéogéniques (lactate, pyruvate, alanine, glycérol) dans le jeûne ou dans le diabète sont très en deçà des concentrations maximales utilisées dans la plupart des expériences décrites. Il faudrait, par conséquent, étudier la régulation de la gluconéogenèse

à partir de substrats utilisés à des concentrations physiologiques, en mesurant également le transport de ces précurseurs qui peut être stimulé par la présence de glucagon. Il faut également mentionner que la régulation de la gluconéogenèse dans le foie perfusé de cobaye ressemble beaucoup à celle du foie perfusé de souris. Chez le cobaye, le glucagon ne stimule pas la gluconéogenèse et, contrairement à ce qui a été décrit chez le rat, les acides gras exogènes inhibent la gluconéogenèse à partir de lactate car l'état ox/red du cytoplasme est plus réduit chez le cobaye que chez le rat. Les différences observées entre le foie perfusé de rat et de cobaye semblent dues principalement à une localisation différente de la phosphoénolpyruvate carboxykinase ainsi qu'à une activité plus faible de la pyruvate kinase chez le cobaye, comparée à celle du rat.

La pyruvate kinase pourrait également être un site de régulation de la gluconéogenèse, différent chez le cobaye et chez le rat. Une synthèse nette de glucose ne peut avoir lieu que si l'activité de la pyruvate kinase est très faible. Dans le cas contraire, la plupart du phosphoénolpyruvate formé à partir de pyruvate serait retransformé en pyruvate. Ces transformations ne changeraient pas le quotient $\frac{\text{lactate utilisé}}{\text{glucose formé}}$ mais agiraient en utilisant de l'ATP sans formation de glucose expliquant que la gluconéogenèse à partir d'une même concentration soit plus importante chez le cobaye, où l'activité de la pyruvate kinase est faible. Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe peu d'informations concernant les activités relatives des enzymes utilisant le pyruvate dans le foie de souris. Les raisons exactes des différences observées entre la régulation de la gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris et de rat restent à investiguer. On

pourrait proposer que, chez la souris, la gluconéogenèse est déjà stimulée au maximum par le glucagon circulant et ne peut par conséquent être encore stimulée par le glucagon ajouté dans la perfusion.

8. Glycogénolyse

Contrairement à la gluconéogenèse, la glycogénolyse paraît très sensible au glucagon puisque dans des perfusions en milieu ouvert, où l'on n'a aucune accumulation de l'hormone infusée, on a déjà une augmentation de la production de glucose à des concentrations de glucagon de 10^{-11} M, la production de glucose est proportionnelle à la quantité de glucagon infusée jusqu'à une concentration de 10^{-8} M. L'effet de concentrations plus élevées n'a pas été étudié. L'absence d'effet du glucagon sur la gluconéogenèse ne peut donc être attribuée à une inactivation de l'hormone ou à une destruction des récepteurs par la perfusion, puisque, en ce qui concerne la glycogénolyse, le foie semble très sensible au glucagon. Il faut des concentrations beaucoup plus élevées d'adrénaline pour obtenir une stimulation de la glycogénolyse (10^{-8} M). Les catécholamines circulantes ne semblent donc pas pouvoir stimuler la glycogénolyse leur concentration maximale (adrénaline + noradrénaline) étant $3 \cdot 10^{-9}$ M chez l'humain adulte. L'AMP cyclique, à des concentrations de 10^{-4} et 10^{-5} M stimule également la glycogénolyse. C'est via une augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire (qui peut augmenter jusqu'à 80 fois (17)) que le glucagon agit sur la glycogénolyse. L'activation de l'adényl cyclase produite par le glucagon a pour conséquence une augmentation de l'AMP cyclique qui à son tour stimule une glycogène phosphorylase et inhibe une glycogène synthétase (13).

PARTIE II

1. Gluconéogenèse dans le foie perfusé de souris obèses et témoins

L'utilisation du foie perfusé a permis de voir si l'hyperglycémie présente chez les souris obèses pouvait être attribuée à une augmentation de la gluconéogenèse hépatique, ce qui paraît peu probable si on tient compte de l'hyperinsulinémie de ces animaux. La gluconéogenèse mesurée dans le foie perfusé de souris obèses et témoins nourries ou à jeun depuis 24 heures permet de voir qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes (Tableaux 6 et 7). Des résultats semblables ont déjà été décrits par un autre groupe (15).

2. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé des souris obèses hyperglycémiques et des souris témoins.

L'incorporation de tritium (provenant d'eau tritiée) dans les acides gras des triglycérides est un moyen d'évaluer la lipogenèse en éliminant le problème de l'activité spécifique du substrat, qui peut être différente dans les deux groupes étudiés. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{atom g } ^3\text{H}^+/\text{g foie}$, il ne paraît pas exact d'utiliser pour le foie les valeurs que Jungas (41) a déterminées dans le tissu adipeux où il a pu mesurer l'incorporation de tritium ($^3\text{H}_2\text{O}$) et celle de glucose marqué. Il a ainsi trouvé une relation de $1.7 \mu\text{atom g } ^3\text{H}^+/\mu\text{mole d'acétyl CoA}$ dans les acides gras. En ce qui concerne le foie, il est difficile de déterminer la lipogenèse par deux mesures indépendantes. En effet, n'importe quel substrat hydrocarboné est dilué dans la cellule hépatique. On ne peut donc connaître avec précision le nombre d'atomes de tritium incorporés par unité

acétyl, de plus ce nombre peut être différent pour les souris obèses et les souris témoins.

La lipogenèse mesurée par l'incorporation de tritium dans les acides gras des triglycérides (AGTG) du foie du perfusat est plus élevée dans le groupe de souris obèses en absence de substrat, indiquant que, chez ces animaux, le glucose, les acides aminés, l'acétyl CoA ainsi que d'autres substrats sont utilisés en plus forte proportion pour synthétiser des acides gras. L'adjonction de substrats dans le perfusat (glucose, acétate, pyruvate, fructose) augmente l'incorporation de tritium dans les acides gras totaux ainsi que dans les AGTG nouvellement synthétisés et sécrétés.

3. Sécrétion de triglycérides par le foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques et témoins

Comme le montre la figure 11, la sécrétion totale de triglycérides (marqués + non marqués) est probablement stimulée de façon maximale dans le foie perfusé d'animaux obèses puisqu'elle ne peut être augmentée par l'adjonction d'acides gras dans le perfusat. Ces acides gras sont captés mais ne sont oxydés que dans une faible proportion (figure 12). Bien qu'il soit difficile d'extrapoler du foie perfusé à la situation in vivo, ces résultats indiquent que le foie produit une grande quantité de lipides qui seront, soit exportés vers la périphérie soit stockés dans le foie sous forme de gouttelettes lipidiques.

4. Incorporation de tritium dans les lipides du foie perfusé de souris obèses-hyperglycémiques traitées à la streptozotocine et au sérum anti-insuline.

Les modifications du métabolisme des lipides mises en

évidence dans le foie perfusé de souris obèses, soit une lipogenèse augmentée, une sécrétion de triglycérides augmentées, une oxydation des acides gras exogène diminuée, pourraient être une conséquence de l'insulinémie élevée de ces animaux. Topping et Mayes (70) ont observé une augmentation de la sécrétion de triglycérides dans le foie de rat perfusé avec un milieu contenant de l'insuline, des acides gras et du fructose, qui semble due plus à une augmentation de l'estérification des acides gras ajoutés qu'à une augmentation réelle de la synthèse des lipides.

Après traitement à la streptozotocine, les valeurs élevées de la lipogenèse et de la sécrétion des triglycérides, sont ramenées à des valeurs voisines de celle des animaux témoins. L'oxydation des acides gras, basse chez les souris obèses devient plus élevée après que l'insulinémie ait été abaissée.

La mesure de la lipogenèse dans le foie perfusé de souris obèses ayant reçu du sérum anti-insuline 2 heures avant renforce l'hypothèse d'une action de l'insuline sur ce paramètre. 2 heures après une diminution aigue de l'insulinémie, l'incorporation de tritium dans les AGTG du foie et du perfusat est diminuée de 40%, on n'observe par contre aucun changement dans la production des triglycérides totaux. Ces résultats suggèrent, sans le prouver, que l'insulinémie élevée des animaux obèses modifie de façon importante le métabolisme des lipides au niveau hépatique.

5. Effet des acides gras sur la lipogenèse

L'action inhibitrice des acides gras sur la lipogenèse observée chez les animaux témoins, ne se retrouve pas chez les animaux obèses. Cette action a lieu par l'intermédiaire de l'acyl

CoA qui inhibe l'acétyl CoA carboxylase (31,32,33,82). Comme dans le foie perfusé des animaux obèses l'oxydation est diminuée au profit de l'estérification, la concentration mitochondriale d'acyl CoA n'atteint probablement pas le niveau qui permettrait cette inhibition.

6. Conclusion

Dans les hépatocytes, le transport du glucose n'est pas sensible à l'insuline (36), le site d'action de celle-ci reste donc à définir. Takeda et coll. (68) ont décrit une action possible au niveau de la glucokinase. Les enzymes de la lipogenèse (palmitate synthétase, acétyl CoA carboxylase) dont l'activité est augmentée chez les animaux obèses (10,44) peuvent également être un des sites d'action de l'insuline. Les résultats présentés dans ce travail montrent indirectement que l'insuline a une action sur le métabolisme des lipides au niveau hépatique sans qu'il soit possible de localiser cette action. Des perfusions de foie de souris témoins avec de l'insuline pourront permettre d'une part de mettre en évidence une possible action directe in vitro, d'autre part de la situer.

Les expériences présentées démontrent que le foie gras des souris obèses hyperglycémiques peut être la conséquence de plusieurs facteurs:

- une augmentation de la lipogenèse
- une absence d'augmentation de la sécrétion de triglycérides en réponse à la présence d'acides gras
- une diminution de l'oxydation des acides gras

Lorsque l'insuline circulante est diminuée par traitement à la streptozotocine on observe une diminution du contenu hépatique en

triglycérides, ainsi qu'une restauration des anomalies du métabolisme des lipides, suggérant sans la prouver une action de l'insuline à plusieurs niveaux du métabolisme hépatique des lipides.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abraham, R.R., E. Dade, J. Elliott, D.A. Hems. Hormonal control of intermediary metabolism in obese hyperglycemic mice. II. Levels of plasma free fatty acids, and immunoreactive insulin and liver glycogen. *Diabetes* 20:535 (1971)
2. Ashmore, J., G. Weber. The role of hepatic glucose-6-phosphatase in the regulation of carbohydrate metabolism. *Vitamins Hormones* 17:91 (1959)
3. Bates, M.W., C. Zomzely, J. Mayer. Fat metabolism in three forms of experimental obesity. IV. Instantaneous rates of lipogenesis in vivo. *Amer. J. Physiol.* 181:187 (1955)
4. Bergmeyer, H.U., E. Bernt. D-glucose. In: *Methods of Enzymatic analysis*. H.U. Bergmeyer, edit. Academic Press, New York p. 123 (1963)
5. Bernt, E., H.U. Bergmeyer. Urea. In: *Methods of enzymatic analysis*. H.U. Bergmeyer, edit. Academic Press, New York and London p. 401 (1963)
6. Bihler, I., B. Jeanrenaud. ATP content of isolated fat cells: effect of insulin, ouabain and lipolytic agents. *Biochim. Biophys. Acta* 202:496 (1970)
7. Bray, G.A. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1:279-285 (1950)
8. Bray, G.A., D.A. York. Genetically transmitted obesity in rodents. *Physiol. Reviews* 51:598 (1971)
9. Brunengraber, H., M. Boutry, J.M. Lowenstein. Fatty acid and 3- β -hydroxysterol synthesis in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 248:2656 (1973)

10. Chang, H.C., I. Seidman, G. Teebor, M.D. Lane. Liver acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthetase: relative activities in the normal state and in hereditary obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28:682 (1967)
11. Chen, R.F. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* 242:173 (1967)
12. Coore, H.G., R.M. Denton, B.R. Martin, P.J. Randle. Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones. *Biochem. J.* 125:115 (1971)
13. De Wulf, H. The control of glycogen metabolism in the liver. Thèse présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Louvain. Vander (ed.) Louvain, 1971
14. Dole, V.P., M. Meinertz. Microdetermination of non esterified fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235:2595 (1960)
15. Elliott, J., D.A. Hems, A. Beloff-Chain. Carbohydrate metabolism of the isolated perfused liver of normal and genetically obese-hyperglycemic (ob/ob) mice. *Biochem. J.* 125:773 (1971)
16. Exton, J.H., C.R. Park. Control of gluconeogenesis in liver. I. General features of gluconeogenesis in the perfused livers of rats. *J. Biol. Chem.* 242:2622 (1967)
17. Exton, J.H., C.R. Park. The role of cyclic AMP in the control of liver metabolism. *Advances in Enzyme Regulation* 6:391 (1968)
18. Exton, J.H., J.G. Corbin, C.R. Park. Control of gluconeogenesis in liver. IV Differential effects of fatty acids and glucagon on ketogenesis and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 244:4095 (1969)

19. Exton, J.H., C.R. Park. Control of gluconeogenesis in liver. III. Effect of L-lactate, pyruvate, fructose, glucagon, epinephrine and adenosine 3',5'-monophosphate on gluconeogenic intermediates in the perfused rat liver. *J.Biol.Chem.* 244:1424 (1969)
20. Exton, J.H., L.E. Mallette, L.S. Jefferson, E.H.A. Wong, N. Friedman, T.B. Miller, C.R. Park. The hormonal control of hepatic gluconeogenesis. *Rec.Progr.Horm.Res.* 26:411 (1970)
21. Exton, J.H., M. Ui, S.B. Lewis, C.R. Park. Mechanism of glucagon activation of gluconeogenesis. In: Regulation of gluconeogenesis. H.D. Söling, B. Willms, edit. Thieme Verlag, Stuttgart p. 160 (1971)
22. Exton, J.H., S.C. Harper, A.L. Tucker, R.J. Ho. Effects of insulin on gluconeogenesis and cyclic AMP levels in perfused livers from diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* 329:23 (1973)
23. Exton, J.H., S.C. Harper, A.L. Tucker, J.L. Flagg, C.R. Park. Effects of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on gluconeogenesis in perfused livers from diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* 329:41 (1973)
24. Folch, J., M. Lees, G.H. Sloane-Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497 (1957)
25. Fried, G.H., W. Antopol. Enzymatic activities in tissues of obese-hyperglycemic mice. *Am. J. Physiol.* 211:1321 (1966)
26. Garcia, A., J.R. Williamson, G.F. Cahill jr. Studies on the perfused rat liver. II. Effect of glucagon on gluconeogenesis. *Diabetes* 15:188 (1966)

27. Garfinkel, D. Resolution by computer simulation of contradictory experimental findings as to the effect on gluconeogenesis of oleate addition in perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:621 (1971)
28. Garfinkel, D. Simulation of the Krebs cycle and closely related metabolism in perfused rat liver. I. Construction of a model. *Computers Biomed. Res.* 4:1 (1971)
29. Garfinkel, D., Simulation of the Krebs cycle and closely related metabolism in perfused rat liver. II. Properties of the model. *Computers Biomed. Res.* 4:18 (1971)
30. Good, C.A., H. Kramer, M. Somogy. The determination of glycogen. *J. Biol. Chem.* 100:485 (1933)
31. Goodridge, A.G. Regulation of the activity of Acetyl Coenzyme A carboxylase by palmitoyl Coenzyme A and citrate. *J. Biol. Chem.* 247:6946 (1972)
32. Goodridge, A.G. Regulation of Fatty Acid Synthesis in Isolated Hepatocytes prepared from the Livers of neonatal chicks. *J. Biol. Chem.* 248:1924 (1973)
33. Goodridge, A.G. Regulation of Fatty Acid synthesis in the liver of prenatal and early postnatal chicks. Hepatic concentrations of individual free fatty acids and other metabolites. *J. Biol. Chem.* 248:1939 (1973)
34. Hasselblatt, A. Die Hemmung der Ketogenese im Lebergewebe durch Tolbutamid und Glycodiazine in vitro. *Arch. Pharmakol. Exptl. Pathol.* 262:152 (1969)
35. Henning, H.V., I. Seiffert, W. Seubert. Cortisol induzierter Anstieg der Pyruvatcarboxylaseaktivität in der Rattenleber. *Biochim. Biophys. Acta* 77:345 (1963)

36. Hetenyi, G., K.H. Norwich, D.R. Studney, and J.D. Hall. The exchange of glucose across the liver cell membrane. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47:361 (1969)
37. Ho, R.J. Radiochemical assay of long chain fatty acids using ⁶³Ni as a tracer. *Anal. Biochem.* 36:105 (1970)
38. Hohorst, H.J. D-(-)-Lactat in *Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer, edit. Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, New York and London, p. 266 (1970)
39. Hollifield, G., W. Parson, C.R. Ayers. In vitro synthesis of lipids from C-14-acetate by adipose tissue from four types of obese mice. *Am. J. Physiol.* 198:37 (1960)
40. Jansen, G.R., M.E. Zanetti, C.F. Hutchison. Studies on lipogenesis in vivo. Fatty acid and cholesterol synthesis in hyperglycaemic-obese mice. *Bioch. J.* 102:870
41. Jungas, R.L. Fatty acid synthesis in adipose tissue incubated in tritiated water. *Biochemistry* 7:3708 (1968)
42. Jungas, R.L. Effect of insulin on fatty acid synthesis from pyruvate, lactate, or endogenous sources in adipose tissue: Evidence for the hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase. *Endocrinology* 86:1368 (1970)
43. Kohout, M., B. Kohoutova, M. Heimberg. The effect of chain length and degree of unsaturation of the fatty acid substrate on the output of triglycerides by the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 210:177 (1970)
44. Kornacker, M.S., J.M. Lowenstein. Citrate cleavage enzyme in livers of obese and non obese mice. *Science* 144:1027 (1964)
45. Krebs, H.A., K. Henseleit. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *J. Physiol. Chem.* 210:33 (1932)

46. Lardy, H. Gluconeogenesis: pathway and hormonal regulation.
Harvey lectures 60:261 (1964-65)
47. Le Marchand, Y., A. Singh, F. Assimacopoulos-Jeannet, L. Orci,
Ch. Rouiller, B. Jeanrenaud. A role for the microtubular
system in the release of very low density lipoproteins by
perfused mouse livers. J. Biol. Chem. 248:6862 (1973)
48. Letarte, J., T.R. Fraser. Stimulation by insulin of the in-
corporation of $U^{14}C$ -glucose into lipids released by
the liver. Diabetologia 5:358 (1969)
49. Loten, E.G., A. Rabinovitch, B. Jeanrenaud. In vivo studies on
lipogenesis in obese hyperglycaemic (ob/ob)mice: Possible
role of hyperinsulinaemia. Diabetologia 10:45 (1974)
50. Lowenstein, J.M. Is insulin involved in regulating the rate of
fatty acid synthesis? In: Handbook of Physiology, section 7,
Endocrinology Vol. 1. Endocrine Pancreas. D.F. Steiner,
E.B. Astwood, edit. American Physiological Society,
Washington, D.C., p. 415 (1972)
51. Mellanby, J., D.H. Williamson. Acetoacetat. In: Methoden der
enzymatischen Analyse. H.U. Bergmeyer, edit. Verlag
Chemie, Weinheim, p. 1776 (1970)
52. Miller, L.L. Some direct actions of insulin, glucagon, and
hydrocortisone on the isolated perfused rat liver. Rec.
Progr. Horm. Res. 17:539 (1961)
53. Miller, L.L., C.G. Bly, M.L. Watson, W.F. Bale. The dominant
role of the liver in plasma protein synthesis. A direct
study of the isolated perfused rat liver with the aid
of lysine- $E-C^{14}$. J. Exp. Med. 94:431 (1951)

54. Nikkilä, E.A. Control of plasma and liver triglyceride kinetics by carbohydrate metabolism and insulin. *Advances Lipid Res.* 7:63 (1969)
55. Passonneau, J.V., H.O. Lowry. Pyruvat. In: *Methoden der Enzymatischen Analyse*. H.U. Bergmeyer, edit. Verlag Chemie, Weinheim, p.1412 (1970)
56. Patzelt, C., G. Löffler, D.H. Wieland. Interconversion of Pyruvate Dehydrogenase in the isolated perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.* 33:117 (1973)
57. Reed, L.J. Pyruvate dehydrogenase complex. In: *Current Topics in Cellular Regulation*. R.L. Horecker, E.R. Stadtman, edit. Acad. Press New York Vol. I p. 233 (1969)
58. Ross, B.D., R. Hems, H.A. Krebs. The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 102:942 (1967)
59. Ross, B.D., R. Hems, R.A. Freedland, H.A. Krebs. Carbohydrate metabolism in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 105:869 (1969)
60. Ruderman, N.B., C.J. Toews, C. Lowy, E. Shafrir. Inhibition of Hepatic gluconeogenesis by pent-4-enoic acid. Role of Redox state, acetyl CoA and ATP. In: *Regulation of Gluconeogenesis*, H.D. Söling, B. Willms, edit. Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York, London p.194 (1971)
61. Seidman, I., A.A. Horland, G.W. Teebor. Glycolytic and gluconeogenic enzyme activities in the hereditary obese-hyperglycemic syndrome and in acquired obesity. *Diabetologia* 6:313 (1970)

62. Shigeta, Y., W.W. Shreeve. Fatty acid synthesis from glucose-1-³H and glucose-1-¹⁴C in obese hyperglycaemic mice. Amer. J. Physiol. 206:1085 (1964)
63. Shrago, E., H.A. Lardy, R.C. Nordlie, D.O. Foster. Metabolic and hormonal control of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in rat liver. J. Biol. Chem. 238:3188 (1963)
64. Söling, H.D., B. Willms, D. Friedrichs, J. Kleinecke. Regulation of gluconeogenesis by fatty and oxidation in isolated perfused livers of non starved rats. Europ. J. Biochem. 4:364 (1968)
65. Söling, H.D., B. Willms, J. Kleinecke, M. Gehlhoff. Regulation of gluconeogenesis in the guinea pig liver. Europ. J. Biochem. 16:289 (1970)
66. Stauffacher, W., L. Orci, D.P. Cameron, I.M. Burr, A.E. Renold. Spontaneous Hyperglycemia and/or obesity in Laboratory Rodents: An example of the possible Usefulness of Animal disease Models with both genetic and environmental Components. Rec. Progr. Horm. Res. 27:41 (1971)
67. Strehler, B.L., J.R. Totter. Firefly Luminescence in the Study of Energy Transfer Mechanisms. I. Substrate and Enzyme Determination. Arch.Biochem.Biophys. 40:28 (1952)
68. Takeda, Y., H. Inoue, K. Honjo, H. Tanioka, Y. Daikuhara. Dietary response of various key enzymes related to glucose metabolism in normal and diabetic rat liver. Biochim. Biophys. Acta 136: 214 (1967)
69. Teufel, H., L.A. Menahan, J.C. Shipp, S. Bönning, O. Wieland. Effect of oleic acid on the oxidation and gluconeogenesis from [1-¹⁴C] pyruvate in the perfused rat liver. Europ. J. Biochem. 2:182 (1967)

70. Topping, D.L., P.A. Mayes. The immediate effects of insulin and fructose on the metabolism of the perfused liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, lipogenesis and carbohydrate metabolism. *Biochem. J.* 126:295 (1972)
71. Ui, M., T.H. Claus, J.H. Exton, C.R. Park. Studies on the mechanisms of action of glucagon on gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 248:5344 (1973)
72. Utter, M.F., C.H. Fung. Possible control mechanisms of liver pyruvate carboxylase. In: Regulation of gluconeogenesis. H.D. Söling, B. Willms, edit. Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York - London, p. 1 (1971)
73. Volpe, J.J., P.R. Vagelos. Saturated fatty acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochemistry* 42:21 (1973)
74. Westman, S. Development of obese-hyperglycemic syndrome in mice. *Diabetologia* 4:141 (1968)
75. Wieland, O.H., C. Patzelt, G. Löffler. Active and inactive forms of Pyruvate Dehydrogenase in rat liver. Effect of starvation and refeeding and of insulin treatment on pyruvate-dehydrogenase interconversion. *Europ.J.Biochem.* 26:426 (1972)
76. Williamson, J.R., E.T. Browning, R. Scholz. Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. I. Effect of oleate on gluconeogenesis in perfused rat liver. *J.Biol.Chem.* 244: 4607 (1969)
77. Williamson, J.R., E.T. Browning, R.G. Thurman, R. Scholz. Inhibition of glucagon effects in perfused rat liver by (+) decanoylcarnitine. *J. Biol. Chem.* 244:5055 (1969)
78. Williamson, D.H., J. Mellanby. D-(-)-3-Hydroxybutyrate. In: Methoden der Enzymatischen Analyse. H.U. Bergmeyer, edit. Verlag Chemie, Weinheim. p. 1772 (1970)

79. Williamson, J.R., R. Scholz, E.T. Browning. Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. II. Interactions between fatty acid oxidation and the citric acid cycle in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 244:4617 (1969)
80. Winand, J. Aspects qualitatifs et quantitatifs du métabolisme lipidique de la souris normale et de la souris congénitalement obèse. Bruxelles: Editions Arscia SA (1970)
81. Windmueller, H.G., A.E. Spaeth. De novo synthesis of fatty acid in perfused rat liver as a determinant of plasma lipoprotein production. Arch. Biochem. Biophys. 122:362 (1967)
82. Yeh, Y., G.A. Leveille. In vitro and in vivo restoration of hepatic lipogenesis in fasted chicks. J. Nutrition 101:911 (1971)

